

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE MOLECOLARI

INDIRIZZO IN SCIENZE FARMACEUTICHE

CICLO XXII

TESI DI DOTTORATO

**NANOASSEMBLATI DI AVIDINA E DNA COME
STRUMENTI IN MEDICINA E DIAGNOSTICA**

DIRETTORE: CH.MO PROF. MAURIZIO CASARIN

SUPERVISORE: DOTT.SSA MARGHERITA MORPURGO

DOTTORANDO: DOTT. MAURO PIGNATTO

INDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| INDICE | 2 |
| 1. RIASSUNTO..... | 5 |
| 2. ABSTRACT..... | 6 |
| 3. INTRODUZIONE | 7 |
| 3.1. Nanoparticelle in biomedicina..... | 7 |
| 3.1.1. Il concetto di “nanotecnologia” e “nanomedicina” | 7 |
| 3.1.2. Applicazioni di nanoparticelle in diagnostica e biologia cellulare | 7 |
| 3.1.3. Nanoparticelle e terapia antitumorale..... | 8 |
| 3.1.4. La farmacocinetica e il destino biologico dei sistemi nanoparticellari..... | 11 |
| 3.1.4.a. Nanoparticelle stealth..... | 12 |
| 3.1.4.b. Il direccionamento passivo..... | 15 |
| 3.1.4.c. Il direccionamento attivo | 16 |
| 3.2. L’ avidina | 18 |
| 3.2.1 La biologia di avidina | 19 |
| 3.2.2. La chimica di avidina e della sua interazione con biotina | 20 |
| 3.2.3 Altre proteine che legano la biotina | 21 |
| 3.2.4. Proprietà meno note dell’avidina | 24 |
| 3.2.5 Il sistema avidina-biotina nel direccionamento di farmaci..... | 27 |
| 3.2.5. Farmacocinetica, biodistribuzione e immunoreattività di avidina e streptavidina | 29 |
| 3.3. Nanoassemblati di DNA e avidina | 30 |
| 3.3.1 Basi molecolari e caratteristiche..... | 30 |
| 3.3.2 Potenziali applicazioni dei nanoassemblati avidina-DNA..... | 32 |
| 4. MATERIALI E METODI..... | 35 |
| 4.1. Materiali..... | 35 |
| 4.2. Strumentazione | 36 |
| 4.3. Procedimenti generali..... | 37 |
| 4.3.1. Determinazione della concentrazione di DNA in soluzione..... | 37 |
| 4.3.1.a. Metodo per UV..... | 37 |
| 4.3.1.b. Metodo per fluorescenza in gel di agarosio | 37 |
| 4.3.2. Determinazione della mobilità elettroforetica del DNA (gel di agarosio) | 38 |
| 4.3.3. Determinazione della concentrazione di avidina in soluzione | 39 |
| 4.3.3.a Metodo per UV..... | 39 |
| 4.3.3.b Metodo per fluorescenza utilizzando biotina-Alexa..... | 39 |
| 4.3.3.c Metodo per HPLC | 40 |
| 4.3.4. Analisi dimensionale e morfologica di complessi avidina-DNA in soluzione..... | 40 |
| 4.3.4.a. Analisi qualitativa per UV | 40 |
| 4.3.4.b. Determinazione della dimensione di particelle in soluzione via <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)..... | 41 |
| 4.3.4.c. Analisi al microscopio ottico | 41 |
| 4.4. Studi di interazione tra avidina e DNA a lunga catena | 42 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4.1. Stechiometria dell'interazione avidina-plasmide in acqua e tampone via HPLC..... | 42 |
| 4.4.2. Determinazione Kd avidina-DNA plasmidico | 43 |
| 4.4.3. Diversa affinità per DNA a diversa sequenza via <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) | 44 |
| 4.4.4. Effetto del PEG sull'interazione avidina-DNA plasmidico | 44 |
| 4.4.4.a PEG-ilazione covalente di avidina | 44 |
| 4.4.4.b PEG-ilazione di avidina mediante complesso con biotina-mPEG | 45 |
| 4.4.4.c Affinità per DNA di avidina e suoi derivati PEG-ilati via <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) | 45 |
| 4.5. Studi di interazione con oligomeri di DNA..... | 46 |
| 4.5.1 Studi di legame attraverso la variazione di fluorescenza del triptofano di avidina..... | 46 |
| 4.5.2. Misura di fenomeni di aggregazione..... | 47 |
| 4.6 Biotinilazione di agenti direzionanti, molecole segnale, attività enzimatiche | 47 |
| 4.6.1 Biotinilazione di IgG | 47 |
| 4.6.2 Biotin-PEG-ilazione di perossidasi | 48 |
| 4.6.3 Biotin-PEG-ilazione di IgG | 48 |
| 4.6.4 Altri derivati biotinilati | 49 |
| 4.7. Nanoassemblati avidina-DNA..... | 49 |
| 4.7.1. Preparazione dei nanoassemblati avidina-DNA | 49 |
| 4.7.2. Funzionalizzazione dei nanoassemblati mediante i siti di legame per la biotina..... | 50 |
| 4.7.3. Purificazione dei nanoassemblati avidina-DNA | 50 |
| 4.7.3.a Purificazione mediante cromatografia di esclusione dimensionale | 50 |
| 4.7.3.b Purificazione mediante ultrafiltrazione in centrifuga..... | 51 |
| 4.7.3.c Purificazione mediante ultrafiltrazione in micro cella..... | 51 |
| 4.7.3.d Purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale..... | 52 |
| 4.7.4 Valutazione dell'efficacia analitica dei nanoassemblati..... | 52 |
| 4.7.4.a Dot Blot a rivelazione fluorescente | 52 |
| 4.7.4.b Dot Blot a rivelazione enzimatica | 53 |
| 4.8. Nanoassemblati avidina-DNA stabilizzati..... | 53 |
| 4.8.1. Preparazione dei nanoassemblati avidina-DNA stabilizzati | 53 |
| 4.8.2. Purificazione dei nanoassemblati avidina-DNA stabilizzati | 54 |
| 4.8.2.a. Purificazione mediante ultrafiltrazione in microcella | 54 |
| 4.8.2.b. Purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale..... | 54 |
| 4.8.3. Valutazione dell'efficacia analitica dei nanoassemblati stabilizzati in saggi immunoenzimatici (ELISA)..... | 54 |
| 4.8.4. Studi di biodistribuzione in vivo | 55 |
| 4.8.4.a. Sintesi della sonda fluorescente biotinilata..... | 55 |
| 4.8.4.b. Preparazione nanoassemblati marcati con biotina-Alexa ⁶⁸⁰ | 56 |
| 4.8.4.c. Verifica della marcatura dei nanoassemblati marcati con biotina-Alexa ⁶⁸⁰ | 56 |
| 4.8.4.d. Stabilità in plasma di nanoassemblati marcati con biotina-Alexa ⁶⁸⁰ | 57 |
| 4.7.4.e Primi studi di biodistribuzione mediante imaging ottico nel vicino infrarosso (NIR)..... | 58 |
| 5. RISULTATI E DISCUSSIONE..... | 59 |
| 5.1. Studio dell'interazione avidina-DNA..... | 59 |
| 5.1.1. Messa a punto delle tecniche analitiche..... | 59 |
| 5.1.2. Studi di interazione con DNA plasmidico..... | 62 |
| 5.1.2.a. Stechiometria dell'interazione in acqua e tampone | 62 |
| 5.1.2.b. Determinazione della Kd in tampone..... | 63 |
| 5.1.3. Studi di interazione con oligomeri di DNA | 66 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.1.4. Prime indagini sulla specificità di legame con DNA a doppio filamento | 79 |
| 5.1.5. Effetto del PEG sull'affinità di avidina per il DNA..... | 81 |
| 5.2. Studio dei nanoassemblati avidina-DNA..... | 87 |
| 5.2.1 Dimensione dei nanoassemblati variando lunghezza e tipo di DNA | 87 |
| 5.2.2. Purificazione dei nanoassemblati..... | 89 |
| 5.2.2.a. Purificazione mediante cromatografia di esclusione dimensionale | 89 |
| 5.2.2.b. Purificazione mediante ultrafiltrazione in centrifuga..... | 90 |
| 5.2.2.c. Purificazione mediante ultrafiltrazione in microcella | 91 |
| 5.2.2.d. Purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale..... | 93 |
| 5.2.3. Efficacia <i>in vitro</i> dei nanoassemblati | 95 |
| 5.2.3.a. Efficacia dei nanoassemblati purificati in dot blot fluorescente | 96 |
| 5.2.3.b. Efficacia dei nanoassemblati purificati in dot blot a rivelazione enzimatica | 97 |
| 5.3. Studio dei nanoassemblati avidina-DNA stabilizzati | 99 |
| 5.3.1. Purificazione dei nanoassemblati stabilizzati..... | 99 |
| 5.3.1.a. Purificazione mediante ultrafiltrazione in micro cella | 99 |
| 5.3.1.b. Purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale..... | 100 |
| 5.3.2. Efficacia <i>in vitro</i> dei nanoassemblati stabilizzati | 101 |
| 5.3.2.a. Effetto del tipo e della quantità di PEG | 101 |
| 5.3.2.b. Effetto del grado di purezza | 102 |
| 5.3.2.c. Effetto della conservazione | 103 |
| 5.3.3 Biodistribuzione dei nanoassemblati stabilizzati | 105 |
| 5.3.3.a. Imaging ottico nel vicino infrarosso | 105 |
| 5.3.3.b. Stabilità in plasma di nanoassemblati marcati con biotina-Alexa ⁶⁸⁰ | 106 |
| 5.3.3.c. Imaging ottico di nanoassemblati marcati con biotina-Alexa ⁶⁸⁰ | 107 |
| 6. CONCLUSIONI | 109 |
| 7. BIBLIOGRAFIA..... | 113 |

1. RIASSUNTO

Questo lavoro origina dalla recente scoperta dell'esistenza in natura di una interazione ad alta affinità tra la proteina avidina e gli acidi nucleici e dal fatto che è possibile guidare tale interazione verso la formazione di nanoassemblati discreti e stabili. L'interesse verso questi sistemi deriva dal fatto che, in quanto costituiti da diverse unità di avidina unite assieme in modo stabile, essi possono potenzialmente trovare impiego in svariate applicazioni biotecnologiche e biomediche in analogia e come miglioramento del sistema avidina-biotina classico.

Il lavoro descritto in questa tesi ha avuto un duplice obiettivo: approfondire le conoscenze relative alle basi molecolari dell'interazione tra avidina e DNA e al contempo valutare le effettive potenzialità in ambito applicativo dei nanoassemblati che originano grazie a tale interazione.

Utilizzando diverse tecniche analitiche quali l'*electrophoretic mobility assay*, il *quench* della fluorescenza del triptofano, l'HPLC e il *light scattering* dinamico è stata studiata l'interazione tra avidina e acidi nucleici di diversa lunghezza (DNA plasmidico, DNA genomico, oligomeri sintetici) a singolo e doppio filamento. I risultati hanno fornito chiare indicazioni sulla dimensione del sito di binding, la modalità dell'interazione con le diverse tipologie di acidi nucleici e le relative costanti di dissociazione Kd.

Lo studio dei meccanismi molecolari alla base dell'interazione tra la proteina e gli acidi nucleici ha permesso di ricavare informazioni preziose per l'ottenimento di formulazioni ottimizzate di nanoassemblati.

Con lo scopo di verificare in termini pratici le potenzialità in ambito diagnostico dei nanoassemblati avidina-DNA è stata valutata la loro performance analitica in saggi di tipo ELISA e *dot blot*. I risultati ottenuti hanno dimostrato in modo inequivocabile la superiorità dei nanoassemblati rispetto all'avidina monomeric.

In vista di un potenziale utilizzo *in vivo* dei nanoassemblati come strumenti in diagnostica e nel direccionamento di farmaci è stata effettuata una prima indagine sulla loro biodistribuzione mediante *imaging* ottico di fluorescenza. I nanoassemblati sono in grado di circolare nel torrente sanguigno per oltre 72 ore e, a parte un lieve accumulo a livello epatico, non risulta evidente una distribuzione preferenziale verso determinati organi.

2. ABSTRACT

This work originates from the recent discovery of the existence in nature of a high-affinity interaction between avidin and nucleic acids which can be guided to give rise to discrete and solution stable polyavidin nanoassemblies.

The interest towards these systems is due to the fact that, since the latter are composed by many avidin units stably assembled, they can potentially be used in several biotechnological and biomedical applications as an improvement of the classic avidin-biotin system.

The work herein described had a two-fold purpose: a) to deepen the knowledge about the molecular basis of the interaction between avidin and DNA and b) to evaluate the potential effectiveness of the nanoassemblies that arise from such interaction.

The interaction between avidin and nucleic acids of different length, single and double stranded (plasmidic DNA, genomic DNA and synthetic oligomers) has been studied by using different analytical techniques, such as electrophoretic mobility assay, tryptophan fluorescence quench, HPLC and dynamic light scattering. The results provided clear indications on the size of the binding site, the mode of interaction with the different types of nucleic acids and their dissociation constants K_d . The results also provided valuable information to obtain optimized nanoassemblies formulations.

ELISA and dot blot assays were performed to verify, in practical terms, the effective analytical performance of these nanoassemblies in *in vitro* diagnostic applications. The results showed the superiority of the nanoassemblies compared to the monomeric avidin.

In addition, in view of a potential use as *in vivo* drug delivery and diagnostics tools, preliminary investigation on the *in vivo* biodistribution – conducted by means of fluorescence optical imaging – was carried out. The nanoassemblies are able to circulate in the blood stream for more than 72 hours and no preferential organ distribution was observed despite some liver accumulation.

3. INTRODUZIONE

3.1. NANOPARTICELLE IN BIOMEDICINA

3.1.1. Il concetto di “nanotecnologia” e “nanomedicina”

Con il termine “nanotecnologia” si include un vastissimo ambito di ricerca e di applicazioni accomunate dal fatto che le dimensioni dei materiali coinvolti ed il loro grado di tolleranza rientrano nel *range* dei 0,1-100 nanometri (Sahoo and Labhasetwar 2003) e, proprio in virtù di queste dimensioni, posseggono proprietà peculiari. Infatti, le caratteristiche chimiche e fisiche dei materiali possono cambiare in modo radicale quando la loro dimensione si riduce a un livello pari a quello di un aggregato di atomi. Dimensioni piccole implicano arrangiamenti spaziali specifici degli atomi di superficie dai quali dipendono le proprietà chimico fisiche del ‘nano-oggetto’ in esame.

Le applicazioni delle nanotecnologie coinvolgono settori i più diversi, tra i quali l’ingegneria, l’elettronica, le scienze dei materiali e la biomedicina. In quest’ultimo campo, le nanotecnologie assumono rilevanza e si sviluppano in quegli ambiti dove il ‘piccolo’ può assumere un ruolo determinante, per esempio nello sviluppo di nuovi sistemi di screening e di *drug discovery*, nel campo dell’*imaging* e della diagnostica, nella terapia genica, e nei sistemi per il rilascio e direzionamento di farmaci dotati di elevata potenza e scarso indice terapeutico o di farmacocinetica sfavorevole.

3.1.2. Applicazioni di nanoparticelle in diagnostica e biologia cellulare

Esempi più significativi di nanosistemi con applicazioni in biologia e medicina sono costituiti dall’oro colloidale (Tyagi and Kramer 1996; Marras, Tyagi et al. 2006), i cristalli di ossido di ferro (Harisinghani, Barentsz et al. 2003; Perez, Josephson et al. 2004) e i quantum dots (QDs) (Dubertret, Skourides et al. 2002; Watson, Wu et al. 2003; Gao, Cui et al. 2004), tutti sistemi particellari di dimensioni dell’ordine di 1-20 nm. Le nanoparticelle di oro vengono usate in esperimenti di *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET), grazie alla loro capacità di assorbire la fluorescenza emessa da molecole vicine. Tale assorbimento avviene solo a brevi distanze dal fluoroforo e la sua entità è inversamente proporzionale a tale distanza. E’ possibile così eseguire studi di interazione tra biomolecole come, ad esempio, tra il DNA ed il suo RNA complementare.

I QDs sono entità nanoparticellari fluorescenti costituite da nanocristalli di semiconduttori. Le lunghezze d’onda di assorbimento ed emissione sono facilmente

modulabili variando le dimensioni delle particelle, mentre le rese quantiche di fluorescenza e la stabilità del segnale sono significativamente superiori a quelle dei classici fluorofori di natura organica. Analogamente a questi ultimi, essi possono essere ancorati a sistemi biologici i quali possono essere visualizzati sia *in vitro* che *in vivo*, come ad esempio provato in una recente applicazione che ha consentito di seguire il trafficking metastatico di un tumore in fase di extravasazione.

I nanocristalli di ossido di ferro trovano anch'essi un impiego in ambito diagnostico. Si tratta di particelle dotate di caratteristiche superparamagnetiche che, date le loro dimensioni, possono essere iniettate nel torrente circolatorio, dove vengono usate come agenti di contrasto in esami di risonanza magnetica.

3.1.3. Nanoparticelle e terapia antitumorale

Oltre alle nanoparticelle aventi applicazioni diagnostiche, esistono attualmente numerose tipologie di costrutti di dimensioni nanometriche (fino a 250 nm) che vengono studiati come sistemi per il trasporto di farmaci e molecole biologicamente attive in genere.

Essi sono basati su sistemi autoassemblati (self assemblies), polimeri a geometrie complesse o sistemi particolati (Moghimi, Hunter et al. 2001b; Moghimi, Hunter et al. 2005).

Uno dei motivi per cui le particelle con dimensioni submicroniche risultano appetibili nel *drug delivery* è che esse sono sufficientemente piccole da poter, almeno in via teorica, circolare liberamente nel torrente circolatorio senza il rischio di creare trombi o emboli. Al contempo, esse sono sufficientemente grandi da poter racchiudere al loro interno più unità attive, cosicché l'attività della singola entità circolante risulta significativamente superiore a quella del farmaco in forma monomerica. Sistemi nanoparticellari sono progettati e preparati al fine di sfruttare particolari caratteristiche morfologiche e funzionali del tessuto tumorali come la rapida proliferazione cellulare, espressione di determinati antigeni o la struttura del sistema vascolare tumorale (Praetorius and Mandal 2007).

In ambito diagnostico e terapeutico costrutti nanoparticellari trovano crescente applicazione in diversi ambiti: chemioterapia, radioterapia, termoterapia, imaging, terapia fotodinamica e antiangiogenica. In aggiunta nanoparticelle multifunzionali possono svolgere simultaneamente più di una funzione ad esempio trasportando un potente farmaco antitumorale assieme ad un agente tracciante permettendo una valutazione in tempo reale della efficacia del trattamento. Alcune delle più recenti

invenzioni relative a sistemi nanoparticellari ideati per la diagnosi e il trattamento del cancro sono riportate in tabella 1. Ad oggi soltanto due farmaci anticancro formulati sfruttando nanostrutture sono utilizzati nella pratica clinica e, cioè: la doxorubicina cloridrato in liposomi PEG-ilati “*stealth*” (Doxil o Caelix, Ortho Biotech) e le nanoparticelle di albumina coniugata a paclitaxel (Abraxane, Abraxis Bioscience).

Tabella 1. Invenzioni brevettate in ambito nanotecnologico per la terapia antitumorale (Praetorius and Mandal 2007).

| Campo d'applicazione | Titolo dell'invenzione | Riferimento |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Drug delivery, targeting | Nanoparticles containing paclitaxel formed by solvent evaporation from oil in water emulsion coated with human serum albumin | Desai, 2004 |
| Drug delivery | Liposomes encapsulating taxol formed by high pressure homogenization | Reszka, 2000 |
| Drug delivery | Water-soluble chitosan containing paclitaxel formed by combining methoxy poly (ethylene glycol) p-nitrophenyl carbonate and cholesteryl chloroformate with the free amine group of a water-soluble chitosan and enveloping the paclitaxel in cholesterol | Nah, 2006 |
| Drug delivery | Gelatin PLGA nanoparticles containing paclitaxel coated with bioadhesive molecules | Au, 2006 |
| Drug delivery | Nanoparticles/liposomes containing Homoharringtonine, Curcumol, Elemene, or Camptothecin and sterically stabilized polysaccharides of kelp as polymer | Liu, 2004 |
| Drug delivery | Liposomes encapsulating cisplatin with the addition of membrane fusion peptides/molecules with fusogenic properties | Boulikas, 2003 |
| Drug delivery | Nanoparticles containing methotrexate formed from water-in-oil emulsion utilizing high-pressure homogenization | Hassan, 2005 |
| Drug delivery | Polymeric nanoparticles containing doxorubicin coated with Tween R80 (Polysorbate) | Kuroda, 2003 |
| Drug delivery, targeting | Hollow protein nanoparticles containing ganciclovir encapsulating thymidine kinase (HSV1tk) modified to display a hepatitis B virus surface-antigen for hepatocyte recognition | Kuroda, 2004 |
| Gene therapy, targeting | Nanoparticles formed from self-assembled aggregates of amphipathic molecules covalently linked to LM609 antibody and complexed with the plasmid | Barchi, 2005 |
| Gene therapy | Nanoparticle containing compacted vector formed by successive additions of oppositely charged polyelectrolytes including an incorporation of ligands into the DNA-polyelectrolyte shells which were mixed with Pluronic F127 gel and polyethylenimine | Boettger, 2003 |

| Campo d'applicazione | Titolo dell'invenzione | Riferimento |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Vaccine therapy, targeting | Nanoparticles/liposomes containing epidermal growth factor receptor vaccine such as the mannan-modified nanoparticle, including mannan-modified recombinant adenoviral EGFR vaccine and protein vaccine, mannanmodified liposome recombinant EGFR gene vaccine and protein vaccine | Tian, 2004 |
| Radiosensitizer, targeting | Gold nanoparticles coated with a mixture of alkanethiol and trimethylammonium thiol ligands | Guo, 2006 |
| Radiosensitizer, targeting | Gold nanoparticles coated with thioglucose molecules and attached to anti-epidermal growth factor receptor antibody | Hainfeld, 2005 |
| Radiotherapy, imaging | Magnetic nanoparticles composed of $Cu_xFe_{1-x}O$ coated with surfactant utilizing decanoic acid and subsequently nonanoic acid | Kim, 2005 |
| Radiotherapy, targeting, imaging | Carbon nanoparticles modified for antibody-antigen targeting utilizing fluorescein isothiocyanate-dextran for imaging. Cavitation induced by ultrasonic waves or local heating of the particles by pulsed electromagnetic radiation | Esnaliev, 2000 |
| Radiotherapy, targeting | Metal sulfide (PbS , ReS_2 , and In_2S_3) nanoparticles designed to replace metal chelates in radioimmunoconjugates | Kotov, 2005 |
| Photodynamic light therapy, targeting | Light-emitting $DdSe$ quantum dots with an attached antibody | Chen, 2002 |
| Radiotherapy, targeting, imaging | $Lu_2SiO_5: Pr$ and $LuPO_4: Bi$ nanoparticles conjugated to antibodies and excited by X-ray radiation leading to VUV or UV-C emission | Juestel, 2005 |
| Imaging | $CdSe-ZnS$ quantum dots were incorporated with Texas Red-labeled dUTP enabling fluorescence energy transfer from excited particles to the dye and leading to a high fluorescence signal | Patolsky, 2005 |

I sistemi di difesa degli organismi viventi contro l'invasione di agenti esterni sono altamente sofisticati, tanto che particelle di dimensioni colloidali estranee vengono facilmente catturate ed eliminate dal circolo grazie all'azione concomitante di diversi agenti 'depuratori'.

Nel corso degli ultimi decenni, si sono accumulate notevoli informazioni sui sistemi responsabili dell'eliminazione dal circolo di nanoparticelle e sui meccanismi attraverso i quali agiscono (Moghimi, Hunter et al. 2005). Queste conoscenze sono servite come base di partenza per l'ideazione di stratagemmi che consentono, almeno in parte, di eludere i sistemi di eliminazione. Sono state così delineate alcune linee guida per

l'ottimizzazione di nanoparticelle per il *drug delivery* in relazione alla farmacocinetica e alla localizzazione desiderata.

3.1.4. La farmacocinetica e il destino biologico dei sistemi nanoparticellari

Sistemi nanoparticellari diversi, quando posti all'interno di ambienti e fluidi biologici, si comportano in modo diverso in termini di stabilità e di distribuzione cellulare ed extracellulare a seconda della loro composizione chimica, della loro dimensione e della loro morfologia (Moghimi, Hunter et al. 2001; Moghimi, Hunter et al. 2005). Il loro destino varia anche a seconda della via di somministrazione scelta.

a. Iniezione diretta nel sistema circolatorio

Una volta iniettate nel torrente circolatorio (i.v.), le particelle vengono eliminate dal circolo principalmente dai macrofagi presenti nel fegato (cellule di *Kupffer*) e nella milza (zona marginale e polpa rossa). Si tratta di una *clearance* sito-specifica che avviene attraverso meccanismi di tipo passivo. Di fatto, questo processo di eliminazione è uno dei componenti del sistema di difesa primario sviluppato contro l'invasione di sostanze particolate 'non-self'.

Questa eliminazione di tipo passivo può essere resa più efficace dal concomitante fenomeno di opsonizzazione, cioè il deposito sulla superficie delle particelle di fattori proteici quali fibronectina, immunoglobuline e proteine del complemento, i quali, a loro volta, facilitano il riconoscimento da parte dei macrofagi.

Diversità nella sensibilità all'opsonizzazione si riflettono direttamente in diverse cinetiche di *clearance* e attivazione da parte dei macrofagi. A questo proposito, le dimensioni delle particelle possono giocare un ruolo importante. Ad esempio, l'attivazione del complemento si verifica solo per particelle di dimensioni pari o superiori ai 200 nm, le quali quindi vengono eliminate rapidamente dalle cellule di *Kupffer*. L'interazione delle particelle con le opsonine e con proteine in generale varia inoltre considerevolmente in quantità e modalità a seconda delle caratteristiche superficiali delle particelle stesse e, in particolare, dalla presenza su di esse di determinati gruppi funzionali e dalla loro densità di carica superficiale. A piccole dimensioni corrisponde un'elevata area superficiale, cui consegue l'accelerazione di tutti i fenomeni tipicamente 'di superficie', tra i quali l'aggregazione e/o l'interazione con componenti del plasma. Ad esempio, è noto che nanoparticelle quali i *quantum dots* e i dendrimeri polimerici sono estremamente suscettibili di aggregazione in ambiente fisiologico, mentre si è osservato che nanoparticelle di natura lipidica possono

interagire considerevolmente con le HDL e LDL plasmatiche con conseguente scambio di componenti lipidici e variazioni dimensionali significative e non facilmente prevedibili. Da tutto ciò risulta evidente come il *design* di qualsiasi nanoparticella debba includere la possibilità di manipolare le sue caratteristiche superficiali.

b. Iniezione interstiziale

L'iniezione interstiziale può risultare una via di somministrazione vantaggiosa quando il bersaglio è uno specifico linfonodo o un gruppo di linfonodi localizzati in una delimitata regione.

Nei capillari linfatici le cellule endoteliali si trovano aderenti una all'altra, ma sono carenti di strutture che determinano una loro serrata adesione. Subito dopo una iniezione interstiziale, quindi, le cellule si allontanano tra loro creando dei passaggi attraverso i quali le particelle possono diffondere fino a raggiungere il nodo linfatico. A livello dei linfonodi il destino delle particelle sarà diverso a seconda delle loro dimensioni e delle loro caratteristiche superficiali. Dimensioni tra 30 e 100 nm sono sufficienti grandi per prevenire un rapido drenaggio delle particelle nei capillari sanguigni. Particelle con dimensioni maggiori di 100 nm sono invece molto suscettibili alla clearance da parte dei macrofagi interstiziali.

Le caratteristiche superficiali influenzano notevolmente la ritenzione nel linfonodo. In generale particelle idrofiliche interagiscono poco con le sostanze presenti nello spazio interstiziale e vengono rapidamente drenate verso i vasi linfatici. Particelle molto piccole (1-20 nm) possono invece raggiungere i linfonodi dal circolo sanguigno tramite extravasazione.

Questi sistemi di movimento delle particelle all'interno dei vasi linfatici forniscono interessanti opportunità diagnostiche. (Moghimi, Hunter et al. 2005).

3.1.4.a. Nanoparticelle stealth

Un sistema nanoparticellare ideale per il *drug delivery* deve essere in grado di circolare il più a lungo possibile nel torrente circolatorio e ciò in virtù delle due principali applicazioni attribuite a questa tipologia di sistema:

- a)** il rilascio controllato e prolungato nel tempo all'interno del torrente circolatorio del farmaco incorporato e
- b)** il direccionamento sito specifico, secondario a meccanismi attivi o passivi.

D'altra parte, come accennato nei paragrafi precedenti, il tipico destino *in vivo* delle nanoparticelle è quello di subire il processo di opsonizzazione e la cattura da parte dei macrofagi e, quando questi fenomeni intervengono, l'emivita plasmatica delle particelle

risulta estremamente breve, nell'ordine dei minuti o loro frazioni. L'entità dell'opsonizzazione e della cattura dei macrofagi dipendono in larga misura dalle caratteristiche di superficie delle particelle ed è noto che modificando tali caratteristiche è, almeno in parte, possibile eludere questi sistemi di cattura: ad esempio, in natura, il batterio *pseudomonas aeruginosa* riesce a sottrarsi a questi meccanismi di difesa ricoprendosi di polimeri idrofilici di acido poliuronico (Cabral, Loh et al. 1987). Di conseguenza, l'attenzione della ricerca si è rivolta verso l'identificazione di strategie che, modificando le proprietà di superficie delle nanoparticelle, permettano di prevenire o rallentare questi fenomeni indesiderati. In questa direzione, i risultati migliori sono stati ottenuti inserendo sulla superficie delle nanoparticelle polimeri idrofilici che, prevalentemente per motivi sterici, diminuiscono o impediscono l'interazione con le opsonine e gli stessi macrofagi. I polimeri più classicamente impiegati per ottenere questi sistemi "invisibili" (*stealth*) sono il polietilenglicole (PEG) o copolimeri nei quali una catena poliossietilenica analoga a quella del PEG è unita assieme a polimeri di natura più idrofobica (es. polipropileneossido/polietileneossido, PEP-PEO). Nel caso del PEG, il polimero viene comunemente unito alla superficie delle nanoparticelle tramite legame covalente con un componente della formulazione. I copolimeri PEP-PEO, invece, essendo di natura idrofilica-idrofobica, sono di fatto dei tensioattivi e si autoassemblano automaticamente sulla superficie delle nanoparticelle attraverso la coda idrofobica esponendo la porzione di poliossietilene (di fatto un PEG) verso l'esterno.

Diversi studi hanno evidenziato che la concentrazione superficiale e l'organizzazione spaziale delle catene polimeriche sulla superficie delle nanoparticelle influenzano direttamente la capacità della nube di poliossietilene di prevenire i fenomeni di opsonizzazione e cattura da parte dei macrofagi.

All'aumentare del numero di unità ossietileniche sulla superficie della particella si osserva l'aumento del suo diametro, la riduzione del suo potenziale ζ di superficie e la concomitante diminuzione della cattura da parte dei macrofagi. Di fatto, esiste una correlazione tra lo spessore dello strato di PEG, l'abbattimento del potenziale ζ e l'inibizione dei fenomeni di cattura (Illum, Jacobsen et al. 1987; Gbadamosi, Hunter et al. 2002). Deve essere tenuto inoltre presente che difficilmente una determinata preparazione di particelle è costituita da un'unica popolazione. Di fatto, in essa coesistono sub-popolazioni caratterizzate da densità di copertura diverse le quali sono quindi più o meno suscettibili alla cattura. Ciò è stato di fatto dimostrato in un elegante studio effettuato da Gbadamosi e Moghimi (Gbadamosi, Hunter et al. 2002) nel quale,

attraverso l'uso della cromatografia idrofobica, sono state isolate e caratterizzate sottopopolazioni di particelle ricoperte di PEG e, successivamente, è stata osservata una correlazione diretta tra il loro grado di copertura e la protezione dai macrofagi.

E' inoltre stato osservato che, in alcuni casi, preparazioni teoricamente *stealth* manifestano questa loro caratteristica *in vivo* solo alla prima iniezione, mentre la seconda somministrazione scompare dal circolo in tempi brevi. Ciò, per esempio, si verifica nel caso di nanoparticelle ricoperte con i copolimeri di PEO con ossido di propilene PEP (PEP-PEO). Questo fenomeno e' stato studiato approfonditamente dal gruppo di Moghimi (Moghimi and Hunter 2001) che ha messo in evidenza, oltre all'effetto di protezione sterica indotta dalle catene di PEO, anche un effetto di attivazione dei macrofagi da parte dei copolimeri PEP-PEO. Come sopra accennato, questi sono dei tensioattivi che, proprio per tale loro proprietà, si assemblano stabilmente attorno alle nanoparticelle. Gli autori sostengono che l'attivazione dei macrofagi avviene già in seguito alla prima somministrazione ma di fatto influenza il destino di quella successiva. Ciò è probabilmente causato proprio dalle caratteristiche tensioattive da cui dipendono: l'interazione con i lipidi di membrana con alterazioni della medesima e l'induzione di fenomeni di attivazione cellulare a cui segue la produzione di citochine diverse (es. IL-8, TNF α e GCSF). L'effetto attivante è comunque temporaneo e scompare dopo circa 10 giorni dalla prima iniezione. E' importante far presente che quando sono così attivati, i macrofagi sono in grado di bypassare l'eventuale barriera sterica presente sulla superficie delle nanoparticelle e sono in grado di fagocitarle anche senza che ci sia stata l'attivazione del complemento (Moghimi, Hunter et al. 2001b). Un fenomeno simile è stato registrato nel caso di formulazioni di liposomi ricoperti da PEG (Dams, Laverman et al. 2000), con la differenza che, in questo caso, l'effetto di attivazione sembra durare meno a lungo (5 giorni anziché 10). E' pur vero che sia nel caso dei copolimeri PEP-PEO che in quello dei PEG-liposomi la componente di PEG è legata ad una porzione idrofobica. A nostra conoscenza, questo tipo di fenomeno non è mai stato riportato nel caso in cui sia presente la sola porzione ossietilenica, per cui sembra legittimo ipotizzare che una strategia *stealth* efficace debba prevedere l'introduzione sulla superficie della sola porzione poliossietilenica senza l'ausilio di un tramite idrofobico.

E' comunque importante far presente che qualsiasi preparazione di nanoparticelle prima o poi andrà incontro ai fenomeni di cattura e distruzione da parte dei macrofagi. Ciò perché è inevitabile che anche i migliori componenti protettivi introdotti sulla

superficie prima o poi si stacchino o si degradino o che si abbiano riarrangiamenti superficiali di diversa natura indotti dall'interazione con componenti del plasma.

3.1.4.b. Il direccionamento passivo

Se a seguito delle manipolazioni superficiali descritte nel paragrafo precedente, si riescono ad evitare i fenomeni di cattura per un tempo sufficientemente lungo e se non sono presenti sulla superficie particellare ulteriori segnali direzionanti, allora fattori di natura "passiva" possono entrare in gioco nel determinare il destino della formulazione nanoparticellare. In particolare, diventano determinanti le dimensioni dell'assemblato e/o la presenza di determinati stati patologici. Questi due elementi determinano l'entità e la localizzazione di un'eventuale extravasazione. Questo fenomeno, ossia la fuoriuscita della nanoparticella dal torrente circolatorio si verifica solo quando le dimensioni di quest'ultima sono inferiori alle fenestrazioni endoteliali. Esistono per esempio distretti dell'organismo dove l'endotelio è fisiologicamente più fenestrato, come a livello del seno epatico dove le fenestrate arrivano fino a 150 nm. Inoltre, esistono stati patologici ai quali si associa una maggiore permeabilità vasale, come ad esempio nell'infiammazione o a livello dei tumori solidi dove, a seguito di una disregolazione del processo angiogenico le finestre possono arrivare fino a 300 nm. In questi casi, nanoparticelle circolanti e di dimensioni compatibili vengono lentamente "filtrate" a livello di queste finestre e sequestrate nel tessuto circostante, ottenendo così una vera e propria localizzazione passiva che viene di fatto sfruttata a livello terapeutico come anche diagnostico, soprattutto in casi di tumori (Moghimi and Hunter 2001; Moghimi, Hunter et al. 2001). La diffusione di nanoparticelle e macromolecole varia sensibilmente a seconda del tipo di tumore, della sua localizzazione anatomica e della struttura della matrice extracellulare. Per questo la dimensione ideale di una nanoparticella, per ottenere un sensibile accumulo a livello tumorale, non sarà unica ma varierà in un intervallo compreso tra pochi fino a 150 nm dipendendo dalle caratteristiche del tumore stesso (Decuzzi, Causa et al. 2006).

Un ulteriore fenomeno del quale bisogna tener conto è la filtrazione da parte della milza, fenomeno che avviene a livello delle fessure endoteliali spleniche e soprattutto ad effetto di particelle rigide e indeformabili di dimensioni superiori ai 200 e i 250 nm. Particelle di queste dimensioni vengono facilmente catturate in questo sito, dove la localizzazione di farmaci o molecole di contrasto può risultare in molti casi vantaggiosa (Moghimi, Hunter et al. 2001).

3.1.4.c. Il direzionamento attivo

I fenomeni di localizzazione finora descritti avvengono secondariamente a processi di diffusione passiva le cui cinetiche sono regolate dalle dimensioni delle particelle, dalla permeabilità e dai coefficienti di diffusione.

Il direzionamento attivo invece si basa sull'impiego di agenti direzionanti, cioè molecole dotate di un preciso tropismo verso specifici distretti dell'organismo o tessuti. Tali molecole, legate alla superficie di particelle *stealth*, sono in grado di guidarle verso un bersaglio prestabilito. Possono fungere da direzionanti molecole di natura diversa, come ad esempio oligosaccaridi (ognuno dei quali viene riconosciuto da una specifica selectina), l'acido folico (noto per il suo tropismo epatico), oligopeptidi (di origine naturale o provenienti da processi di screening, ognuno con una sua specifica selettività), anticorpi integri o i loro frammenti F(ab') o F(ab')₂.

a. Direzionamento tramite anticorpi

Negli ultimi anni, diversi anticorpi o loro derivati sono stati introdotti nell'uso clinico, soprattutto per il trattamento di tumori (tabella 2) (Brannon-Peppas and Blanchette 2004). L'attività antitumorale di questi anticorpi, però, è dovuta ad una loro azione diretta sulle cellule malate. Non si tratta quindi di un'azione direzionante vera e propria, poiché nessuna di queste applicazioni vede l'impiego dell'anticorpo come trasportatore di un farmaco diverso da se stesso.

Nonostante anticorpi diversi da questi siano stati e vengano ancora oggi studiati come potenziali trasportatori di sistemi nanoassemblati e sebbene la letteratura in questo ambito sia piuttosto corposa, i casi di successo *in vivo* sono scarsi e mancano ad oggi delle efficaci dimostrazioni pratiche. Ciò probabilmente perché nel direzionamento attivo entrano in gioco numerose variabili tra cui il delicato bilanciamento della concentrazione superficiale del ligando da cui dipendono l'efficacia localizzante ma anche l'entità di una eventuale risposta anticorpale. Per esempio, nel caso di una formulazione di PEG-immunoliposomi, è stato osservato che quando sono state usate meno di $3,3 \times 10^{-4}$ molecole di anticorpo per ogni fosfolipide, le nanoparticelle hanno avuto un'emivita più breve di quelle prive di anticorpo ma si è ottenuto un certo grado di localizzazione. Quando invece si è usato il doppio quantitativo di anticorpo, le nanoparticelle sono state eliminate rapidamente dal circolo ad opera dei macrofagi del sistema reticolo endoteliale (Allen, Ahmad et al. 1995). In un altro caso, si è ottenuta una formulazione di PEG-immunoliposomi, (contenente 18 molecole di anticorpo per liposoma) che ha mostrato una permanenza in circolo prolungata alla prima

somministrazione (Harding, Engbers et al. 1997) ma che, alla seconda iniezione, e' stata eliminata rapidamente a causa di un elevato titolo di anticorpi indotti dalla prima dose. Il medesimo problema si e' osservato anche con l'uso di frammenti di anticorpi Fab'.

C'e' poi da notare che le immuno-nanoparticelle spesso si fermano alla superficie del tumore e non riescono a penetrarlo con scarsa efficacia terapeutica, come già precedentemente accennato. Di fatto, ad oggi, il *targeting* attivo di nanoparticelle indotto da anticorpi non si è dimostrato efficace e attualmente sembra che solo la manipolazione genetica delle sequenze anticorpali potrà portare a risultati migliori (Moghimi and Hunter 2001)

Tabella 2. Anticorpi usati in terapia antitumorale (Brannon-Peppas and Blanchette 2004).

| Nome generico | Nome commerciale | Produttore, anno di approvazione | Bersaglio e indicazioni |
|-----------------------|------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rituximab | Rituxan® | IDEC Pharmaceuticals, 1997 | Anticorpo anti CD-20 per linfoma refrattario CD-20 positivo non Hodgkins e linfoma follicolare |
| Trastuzumab | Herceptin® | Genetech, 1998 | Blocca recettore HER-2 per il cancro metastatico al seno HER-2 positivo |
| Gemtuzumabozogamicina | Mylotarg® | Wyeth Pharmaceuticals, 2000 | Anticorpo anti CD-33 per leucemia mieloide acuta refrattaria |
| Alemtuzumab | Campath® | Berlex Laboratories, 2001 | Anticorpo anti CD-52 per leucemia linfocitica cronica |
| Ibritumomab tiuxetan | Zevalin® | IDEC Pharmaceuticals, 2002 | Anticorpo anti-CD20 per linfoma-nonHodgkins Rituximab resistente |
| Gefitinib | Iressa® | Astra Zeneca, 2003 | Blocca recettore epidermico per il fattore di crescita e l'attività tirosinchinasica per tumore polmonare avanzato |

b. Direzioneamento tramite acido folico

L'idea di usare l'acido folico come agente direzioneante in terapia antitumorale deriva dal fatto che molti tumori (ovaie, endometrio, colon-retto, seno, polmone, rene, metastasi cerebrale derivata da tumori epiteliali..) esprimono alti livelli del recettore per esso, mentre lo stesso è assente nella maggior parte dei tessuti sani ad eccezione della placenta, il plesso corionale, i polmoni, la tiroide e il rene. L'acido folico, inoltre e' una molecola piccola, non immunogenica e facile da manipolare. Ciononostante la sua reale efficacia nell'ambito del direzioneamento attivo di nanoparticelle e' ancora da provare.

c. Altre potenziali molecole direzioneanti

Nonostante ad oggi l'efficacia del direzioneamento attivo nel campo delle nanoparticelle sia ancora tutto da dimostrare, e' pur vero che numerosi nuovi potenziali agenti direzioneanti con nuove potenzialità tutte ancora da testare sono in via di studio. Tra questi citiamo ad esempio svariate sequenze oligopeptidiche identificate mediante *phage display* (Pasqualini and Ruoslahti 1996; Pasqualini and Ruoslahti 1996; Koivunen, Arap et al. 1999). Alcune di esse sono sufficientemente corte da poter eludere la risposta immunitaria secondaria all'esposizione da parte delle MHC1 (Koopmann, Post et al. 1996). Inoltre, sequenze antisenso (in forma di DNA o di analoghi chimicamente stabili come i Peptide Nucleic Acids- PNA) riconoscono RNA messaggeri selettivamente espressi da determinati tessuti (es il gene della survivina nei tumori). Questa ultima strategia di direzioneamento richiede anche l'internalizzazione cellulare del nanoassemblato, ma parziali successi di direzioneamento sono già stati evidenziati (Tyler, Jansen et al. 1999).

3.2. L' AVIDINA

L' avidina è una glicoproteina omotetramerica presente nell'albume dell'uovo di più specie, in particolare uccelli (nella gallina si trova alla concentrazione dello 0,05% (Li-Chan E.C.Y. 1995) rettili e anfibi. Deve la sua notorietà al fatto di possedere capacità di legare, per ciascuna sub-unità, una molecola di biotina (vitamina H) con una costante di dissociazione K_d pari a circa $10^{-15}M$, di fatto la più elevata tra quelle note. La forza di legame è tale che l'energia di stabilizzazione derivante dall'interazione è dello stesso ordine di grandezza di quella di un legame covalente, per cui l'interazione avidina-

biotina è considerata praticamente irreversibile, a meno che non intervenga un qualche processo di denaturazione (Wilchek and Bayer 1990).

Grazie a questa peculiare proprietà, l'avidina è impiegata come strumento molecolare in biomedicina, come verrà descritto in modo più approfondito in un paragrafo successivo.

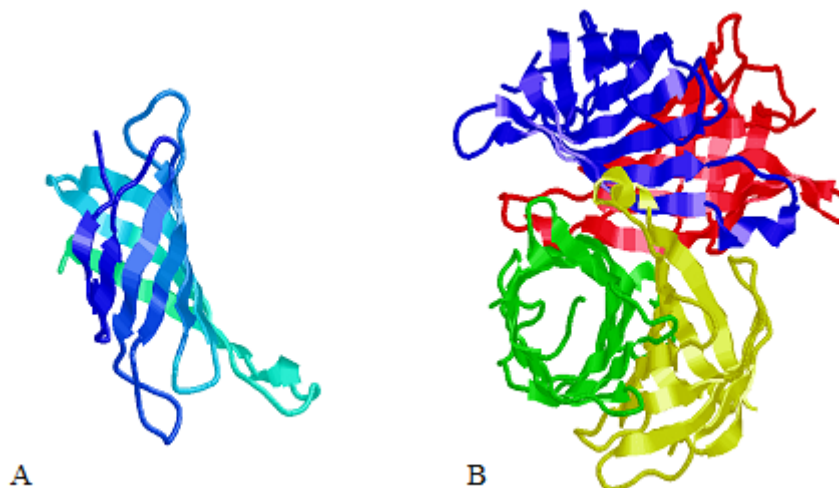


Figura 1. Modello tridimensionale della struttura monomerica (A) e tetramERICA (B) dell'avidina. A ciascun colore in figura B corrisponde uno dei quattro monomeri. Le coordinate sono state gentilmente fornite dal prof. M. Wilchek.

3.2.1 La biologia di avidina

Oltre che nell'uovo, l'avidina è presente a livello del tratto riproduttivo delle specie ovipare (uccelli, rettili e anfibi), dove viene indotta da necessità di difesa attraverso due meccanismi alternativi, progesterone-dipendente e progesterone-indipendente, l'ultimo inducibile da situazioni diverse quali l'infezione da parte di batteri o virus, la presenza di elementi tossici o la presenza di lesioni tissutali. Essa sembra quindi essere un agente antimicrobico che protegge lo sviluppo dell'uovo e dell'embrione dalle infezioni batteriche e virali (Tuohimaa, Joensuu et al. 1989) attraverso tre meccanismi: a) il sequestro di biotina necessaria alla crescita dei microrganismi (Board and Fuller 1974), b) un'azione immuno-modulatoria durante il passaggio dell'uovo nell'ovidotto (Ashorn, Eskola et al. 1986), c) effetti metabolici.

La funzione dell'avidina non sembra però essere limitata alla riproduzione, in quanto in alcune specie essa viene trovata nei polmoni e nei reni di animali anche se non trattati, mentre la si ritrova nella maggior parte dei tessuti in seguito ad una loro lesione.

Questo suggerisce che essa abbia un ruolo nella fase acuta della difesa dell'ospite. Questa ipotesi è tra l'altro avvalorata dal fatto che essa viene indotta dalla presenza di microorganismi (Elo, Raisanen et al. 1980).

In realtà nel pollo sono stati individuati cinque geni omologhi all'avidina, chiamati *avidin-related genes 1-5* (AVR1-AVR5) (Keinanen, Laukkanen et al. 1988; Keinanen, Wallen et al. 1994) che sono tra loro identici con una percentuale che va dal 94 al 100% e uguali all'avidina tra il 91 e il 95% (Wallen, Laukkanen et al. 1995).

Nel processo evolutivo, il gene per l'avidina è comunque stato perso piuttosto presto, dato che essa già non si ritrova più nel tratto riproduttivo degli opossum. Nell'uomo e nei mammiferi in generale essa non è quindi presente, ma viene invece assunta attraverso la dieta e, data la sua caratteristica di sequestrare la vitamina H, se assunta in grandi quantità può causare avitaminosi, con conseguenti effetti nel processo metabolico.

3.2.2. La chimica di avidina e della sua interazione con biotina

Essa è una proteina basica, il suo punto isoelettrico è di 10,5 grazie alla presenza di numerose lisine e arginine; ciascuna subunità, composta da 128 amminoacidi, pesa circa 16000 Da ed è glicosilata a livello della asparagina 17. La composizione della porzione glucidica è eterogenea, ma comunemente comprende 4 o 5 residui di mannosio e circa 3 residui di N-acetilglucosammina. La componente glucidica non ha nessuna influenza sul legame con la biotina e può essere rimossa attraverso un semplice trattamento enzimatico (Ng-Av, lite-avidina), con l'unico apparente effetto di diminuire in piccola misura la solubilità della proteina (Wilchek, Bayer et al. 2006).

Il legame con la biotina altera sia lo spettro di emissione di fluorescenza sia lo spettro di assorbimento UV dell'avidina (Green 1963; Green 1964). I cambiamenti nello spettro sono stati interpretati in termini di movimento dei triptofani in un ambiente più idrofobico e protetto (Green 1975). Ciascuna subunità, infatti, è strutturata in un α -*barrel* costituito da 8 sequenze α -*sheet* antiparallele. Il sito di legame per la biotina si ritrova all'interno del *barrel*, in una zona altamente idrofobica. In essa, l'anello imidazolintiofenico della biotina si trova circondato dalla tirosina 33, la fenilalanina 79 ed i triptofani 70 e 97. L'avidina possiede infatti quattro triptofani per subunità (DeLange and Huang 1971). I vari studi hanno mostrato che tre di essi, il 70, il 97 e il 110, sono interessati al legame con la biotina. Mentre i primi due provengono dallo stesso monomero in cui si trova la biotina, il triptofano 110 proviene dal monomero adiacente,

dove si trova in un *loop* che in assenza di biotina non è strutturato, ma che si struttura in sua presenza (figura 2).

Modificazioni dei triptofani 70 e 110, con un reagente colorato e selettivo per questi amminoacidi, il 2-idrossi-5-nitrobenzil bromuro, che permette la localizzazione dei residui modificati, causano la perdita di affinità per la biotina (Gitlin, Bayer et al. 1988). In realtà, la modificazione di uno solo dei triptofani presenti nella subunità è sufficiente ad inibire il legame con la biotina.

Oltre ai triptofani, sono essenziali per il legame con la vitamina anche i residui di lisina 45, 94 e 111, (Gitlin, Bayer et al. 1987).

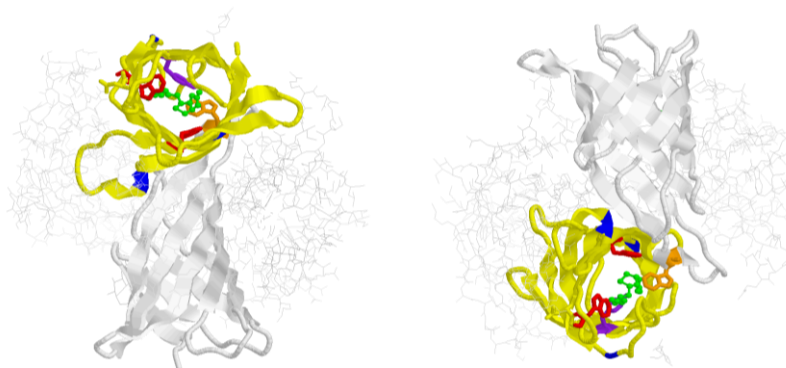


Figura 2. Il sito di legame per biotina con evidenziati i principali amminoacidi coinvolti nell'interazione con il ligando: in viola la tirosina 33, in rosso i triptofani 70 e 97, in arancione il triptofano 110 proveniente dal monomero adiacente, in blu lungo la catena sono indicate le lisine 45, 94 e 111. In verde la biotina. Per chiarezza è stato evidenziato un solo sito di legame e i due monomeri coinvolti. La stessa immagine è mostrata da due punti di vista opposti. Le immagini sono state generate con il programma Ras-mole.

3.2.3 Altre proteine che legano la biotina

Streptavidina

La streptavidina (StAv) è una proteina di origine batterica che condivide con l'avidina molte delle sue caratteristiche: è anch'essa un omotetramero con elevata capacità di legare la biotina ($K_d = 10^{-13}M$) e possiede una struttura terziaria e quaternaria quasi sovrapponibili a quelle della proteina dell'uovo (Weber, Cox et al. 1987; Pugliese, Coda et al. 1993; Pugliese, Malcovati et al. 1994; Nardone, Rosano et al. 1998). Ciò nonostante, Av e StAv, condividono una scarsa omologia di sequenza (30% di omologia) e hanno caratteristiche chimico fisiche diverse. Tra queste, il punto isoelettrico che è di 6,4. Inoltre, StAv, essendo di origine batterica, non possiede una porzione glucidica.

Avidina

ARKCSLTGKWTNDLGSNMTIGAVNSRGEFTGTYITAVTATSNEIKESPLHGTENTINKRTNPT
FGFTVNWKFSESTTVFTGNCFIDRNGKEVLKTMWLLRSSVNDIGDDWKATRVGINIFTRLRTQ
KE

Streptavidina

MDPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRY
DSAPATDGSALTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAW
KSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVN NGNPLDAVQQ

Figura 3. Sequenza amminoacidica di avidina e streptavidina.

Tamavidina

La tamavidina 1 e la tamavidina 2 sono state trovate nel fungo *Pleurotus cornucopiae*, conosciuto come fungo *Tamogitake*. Entrambe hanno la sequenza amminoacidica rispettivamente uguale all'avidina per il 31% e il 36%, e uguale alla streptavidina per il 47% e il 48%. I parametri cinetici, misurati dal biosensore BIAcore, indicano che la tamavidina 2 lega la biotina con alta affinità, in ugual misura dell'avidina e streptavidina; inoltre è molto simile alla streptavidina in termini di arrangiamento dei residui che interagiscono con la biotina, ma differente in merito al numero di legami ad idrogeno alla biotina carbossilata. La tamavidina 2 è anche più stabile alle alte temperature dell'avidina e streptavidina e lega il DNA in modo non-specifico con un'affinità inferiore rispetto all'avidina (Takakura, Tsunashima et al. 2009).

Rizavidina

La rizavidina proviene dal proteobatterio *Rhizobium* ed ha un'alta affinità per la biotina. Le sue proprietà funzionali e strutturali sono state ampiamente studiate ed è stato scoperto che, a differenza della tetramerica avidina, è una proteina dimerica. La sua sequenza amminoacidica è omologa all'avidina per il 20-30%. Inoltre nella rizavidina, il residuo importante nel legame con la biotina e che distingue la struttura tetramerica dell'avidina, il triptofano 110, è sostituito da una prolina (Helppolainen S.H. et al., 2007). Di conseguenza il sito di legame per la biotina risulta parzialmente accessibile (Meir A. et al., 2009). La sua stabilità termica è inferiore a quella dell'avidina. La reattività immunologica della rizavidina è stata testata in alcuni campioni di siero umano provenienti da pazienti aventi il cancro esposti all'avidina e non è stata osservata una significativa reattività. La biodistribuzione della proteina è stata studiata nei topi e similamente all'avidina, si accumula rapidamente, soprattutto nel fegato. La rizavidina può essere utilizzata insieme all'avidina o streptavidina nella tecnologia avidina(streptavidina)-biotina (Helppolainen, Nurminen et al. 2007).

Proteina A (BBP-A)

Il genoma dei polli contiene un gene BBP-A che mostra caratteristiche simili ai geni della famiglia dell'avidina. Recenti studi hanno riportato un'alta similarità con l'avidina nella sequenza amminoacidica, soprattutto nella regione importante per il legame. La proteina BBP-A lega 3 molecole di biotina con un' alta costante di affinità, K_d , pari a 10^{-13} M, simile alla streptavidina. Si differenzia però dagli altri membri della famiglia dell'avidina per la stabilità termica e le proprietà immunologiche. Viene comunque utilizzata nelle moderne applicazioni bio(nano)tecnologiche (Hytonen, Maatta et al. 2007).

Bradavidina

Il *Bradyrhizobium japonicum* è un importante batterio nel quale è stata trovata questa proteina, che presenta una sequenza amminoacidica omologa all'avidina e alla streptavidina per circa il 30%. La bradavidina, che mostra anch'essa un'alta affinità per la vitamina H, può essere utilizzata nel *drug delivery*, nella terapia genica e nell'*imaging* come una valida alternativa alla streptavidina quando non può essere usata, per esempio nei pazienti con risposta immunitaria e nelle svariate applicazioni nella tecnologia avidina-biotina (Nordlund, Hytonen et al. 2005).

Proteine derivanti da AVR1-5

Come sopra accennato, nel pollo sono stati trovati cinque geni omologhi all'avidina chiamati *avidin-related genes 1-5* (AVR1-AVR5) (Keinanen, Laukkanen et al. 1988; Keinanen, Wallen et al. 1994) che sono tra loro identici con una percentuale che va dal 94 al 100% e uguali all'avidina tra il 91 e il 95% (Wallen, Laukkanen et al. 1995). Questi geni sono stati utilizzati per produrre proteine AVR ricombinanti, per caratterizzare la loro affinità per la biotina e le loro proprietà biochimiche. Per spiegare le loro proprietà sono state effettuate le analisi della sequenza amminoacidica e della struttura molecolare. È stato trovato che queste proteine sono molto simili all'avidina sia nella struttura che nella funzione e nonostante le numerose sostituzioni di amminoacidi, le AVR sono tetrametri estremamente stabili. Inoltre, tutte le forme passano da uno stato tetramerico, a dimerico e poi monomero, facendo eccezione per l'AVR2 che passa direttamente nello stato monomero, come la nativa avidina. Sono comunque state riscontrate delle differenze nelle proprietà fisico-chimiche, come un punto isoelettrico più basso, un aumento della glicosilazione e il più importante, un legame reversibile con la biotina per AVR1 e AVR2. L'analisi della struttura molecolare mostra infatti che nell'AVR2 la sostituzione della lisina111 con un' isoleucina altera la

geometria della tasca per la biotina e questo comporta un legame reversibile. L'AVR1 possiede il 18% di reversibilità, mentre l'AVR2 raggiunge il 93%; le costanti di associazione per la vitamina H variano da 10 μ M a 5nM. Inoltre, le analisi biochimiche rivelano che il legame disolfuro può formare e legare monomeri nelle AVR4 e 5, una proprietà che non è stata riscontrata nell'avidina. Queste, insieme ad altre importanti proprietà, possono offrire vantaggi nelle applicazioni delle AVR nella tecnologia avidina-biotina (Laitinen, Hytonen et al. 2002).

In particolare, l'AVR2 è stata studiata in maniera più approfondita da Hytönen e altri ricercatori dell'università di Turku in Finlandia (2005), che hanno impiegato numerosi metodi biochimici per studiare la relazione struttura-funzione. Sono state riscontrate delle differenze, soprattutto a livello dell'interfaccia della subunità 1-3, che è maggiormente stabilizzata da interazioni polari nell'AVR2, da interazioni idrofobiche nel caso dell'AVR4 e dell'avidina, e in vicinanza della tasca per il legame con la biotina.

Secondariamente, sono state effettuate analisi di dissociazione competitiva, mutagenesi e analisi al DSC (*Differential Scanning Calorimetry*), per studiare e confrontare le proprietà di legame con la biotina e la stabilità termica delle AVR. La mutazione 1109K aumenta l'affinità per la biotina dell'AVR2, mentre la mutazione K1091 diminuisce invece l'affinità di legame dell'AVR4. La stabilità termica dell'AVR2 aumenta comparandola con la proteina, mentre diminuisce quella dell'AVR4 (Hytonen, Maatta et al. 2005).

3.2.4. Proprietà meno note dell'avidina

Recenti studi hanno evidenziato un'altra proprietà dell'avidina, cioè quella di legarsi agli acidi nucleici mediante un'interazione ad alta affinità, che aumenta in presenza di biotina, mentre la streptavidina, il suo analogo non glicosilato, non lo fa (Morpurgo, Radu et al. 2004). Indagini ultrastrutturali e *al light scattering* hanno dimostrato un'inaspettata forza di interazione tra la proteina e gli acidi nucleici e mostrano che l'avidina si autoassembla sul DNA in maniera organizzata (figura 3).

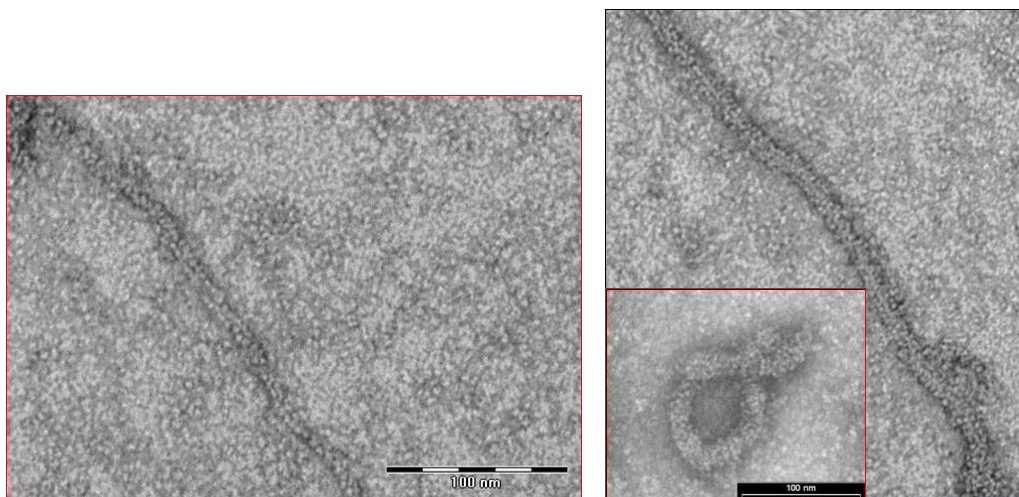
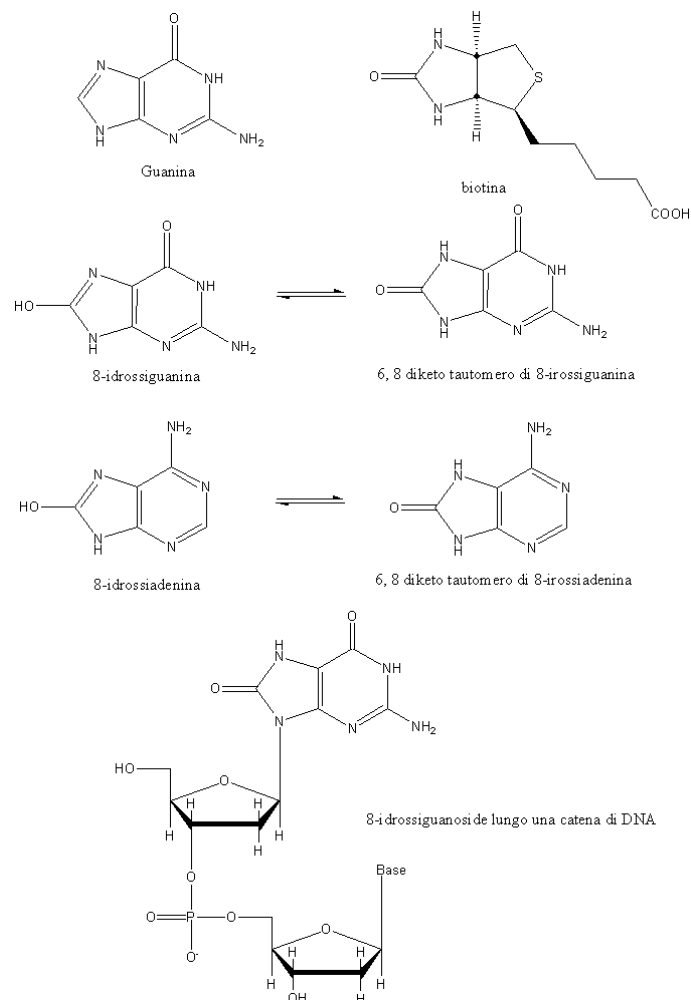


Figura 3. Immagini al microscopio elettronico di assemblati di avidina con DNA plasmidico circolare o linearizzato (da Morpurgo M. et al., 2004).

Altri ricercatori hanno inoltre evidenziato che l'avidina è in grado di legare l' 8-ossi-desossiguanosina e la 8-ossi-desossiadenosina e le relative basi con una modesta affinità, K_d rispettivamente di 117 e 24 μM . In particolare l' 8-ossi-deossiguanosina è un indicatore di un danno ossidativo al DNA. I primi studi condotti da (Struthers, Patel et al. 1998) avevano suggerito che le 8-ossi-desossipurine potessero interagire con l'avidina a livello del sito di binding per la biotina, data la loro similitudine strutturale con l'anello bi-ciclico di quest'ultima (schema 1).

I dati cristallografici successivi (Connors, Hooley et al. 2006) hanno in effetti dimostrato che l'interazione tra avidina e l' 8-ossi-desossiguanosina e l' 8-ossi-desossiadenosina avviene a livello del sito di legame per la biotina, anche se la modalità dell'interazione è molto diversa per le due basi ossidate. In particolare, solo nel caso della 8-ossi-desossiguanosina l'interazione è compatibile con la presenza della base ossidata all'interno di una sequenza di DNA. Infatti, nel caso della 8-ossi-desossiadenosina, l'interazione con la tasca avviene in modo tale per cui la componente desossiribosica della molecola si orienta verso l'interno della tasca, e ciò non è compatibile con la presenza di una base adiacente (figura 4).



Schema 1. La struttura chimica di derivati di guanina e adenina e dei loro prodotti di ossidazione all'anello purinico. Le strutture degli ossi-derivati sono messe a confronto con l'anello imidiazolino-tiofenico della biotina.

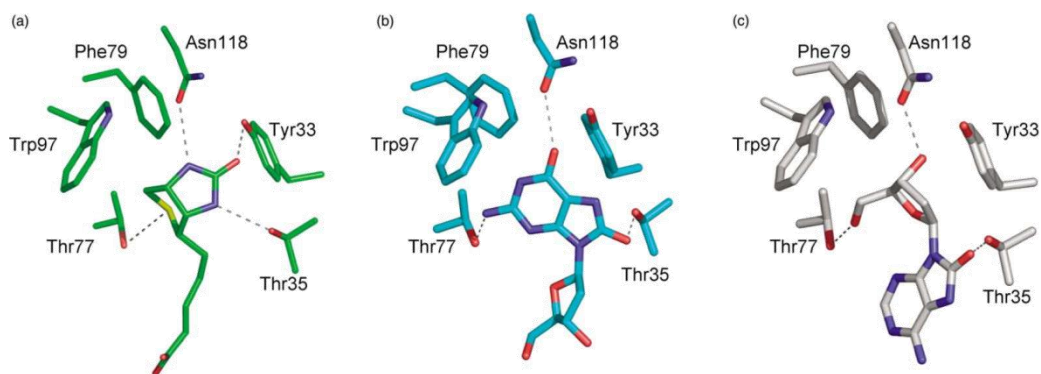


Figura 4. Struttura cristallina dei complessi avidina-biotina (a) e avidina 8-ossi-deossi-guanosina (b) e avidina 8-ossi-deossi-adenosina (c). Sono evidenziati gli amminoacidi coinvolti nella interazione (da Connors, 2005).

Gli studi di fluorescenza descritti nel medesimo lavoro hanno rilevato costanti di interazione nell'ordine del micromolare, e costanti dello stesso ordine di grandezza nell'interazione con oligomeri di DNA a singola catena costituiti da 7 o 13 basi (Conners, Hooley et al. 2006). Nessuna interazione sembra essere stata rilevata nel caso di DNA a doppia catena (16 bp), in qualche modo contraddicendo quanto osservato attraverso tecniche *gel agarose retardation* e *light scattering* con il DNA plasmidico, attraverso le quali l'interazione con il DNA a doppia catena sembrava essere ad altissima affinità (Morpurgo, Radu et al. 2004).

3.2.5 Il sistema avidina-biotina nel direccionamento di farmaci

3.2.5.1. Il pretargeting

Con il termine *pretargeting* si intende genericamente una procedura di somministrazione di agenti attivi nella quale ci si avvale di un agente direzionante che viene somministrato separatamente dall'agente attivo. Esistono diverse strategie di *pretargeting* ma, in ogni caso, esse sono state ideate con lo scopo di aumentare la dose di farmaco che arriva al sito malato, genericamente un tumore, e al contempo diminuire la quantità di esso in circolo in quanto responsabile degli effetti indesiderati. Più specificamente, il *pretargeting* è stato ideato per la somministrazione di radiofarmaci e in particolare per migliorare le prestazioni della classica radioimmunoterapia (RIT), che prevede l'impiego di anticorpi specifici diretti contro i tumori, funzionalizzati con radioisotopi (più comunemente ^{131}I o ^{90}Y) beta emettitori. Attualmente esistono due prodotti di RIT approvati negli Stati Uniti, entrambi costituiti da un anticorpo monoclonale anti-CD20 marcato con ^{131}I o ^{90}Y , ma il limite di questa terapia sta proprio nel fatto che la dose di radioattività che arriva al bersaglio è poca, tant'è che è efficace solo nel trattare neoplasie ematopoietiche e non tumori solidi in stadio avanzato.

Il *pretargeting* è stato quindi ideato per aumentare il rapporto tra la dose che giunge al tumore e quella circolante nel torrente ematico. Come accennato precedentemente, esistono almeno 5 approcci diversi di *pretargeting*, tutti si avvalgono di anticorpi monoclonali in grado di riconoscere epitopi tumorali e che sono anche in grado di legare, attraverso una seconda funzione, un secondo componente. Il radiofarmaco viene legato a questo secondo componente e viene somministrato solo dopo che l'anticorpo si è localizzato a livello tumorale e la sua frazione libera è stata rimossa dal

circolo. In tabella 3 vengono riassunte le 5 strategie di *pretargeting* più comuni (Goldenberg, Sharkey et al. 2006)

Due di queste prevedono l'uso di avidina e/o streptavidina (Goldenberg and Sharkey 2006). Le modalità e i tempi di somministrazione sono diversi nei due casi, ma il principio di base e' lo stesso: viene inizialmente somministrato un anticorpo monoclonale chimicamente coniugato con biotina o con streptavidina, dopo circa 24h l'eccesso circolante viene rimosso mediante l'introduzione di un agente 'chiarificante' seguito, dopo circa 30 minuti, in un caso da streptavidina e dal radiofarmaco legato a biotina attraverso un chelante specifico, nell'altro caso solo dal radiofarmaco biotinilato. I vantaggi del pretargeting sono stati dimostrati su animali ma anche nell'ambito dell'imaging diagnostico e in studi clinici, anche se esistono ancora problemi da superare per migliorarne l'efficienza. Esistono numerose reviews sull'argomento alle quali si rimanda il lettore interessato (Paganelli, Magnani et al. 1991).

Tabella 3. Metodi di pretargeting (Goldenberg, Sharkey et al. 2006).

| Metodo di pretargeting | STEP 1 | STEP 2 | STEP 3 |
|-------------------------------|---------------|-------------------------|----------------------|
| Anticorpo biospecifico | bsMAb | Aptene radiomarcato | - |
| StAv-biotin | StAv-MAb | Agente purificante | Biotina radiomarcata |
| Avidin-biotin | MAb-biotin | Avidina seguita da StAv | Biotina radiomarcata |
| Nucleotidi oligocomplementari | MAb-oligo | Oligo complementare | Oligo radiomarcato |
| ADEPT | MAb-enzima | +/- step di lavaggio | Profarmaco |

3.2.5. Farmacocinetica, biodistribuzione e immunoreattività di avidina e streptavidina

Le applicazioni del sistema avidina-biotina nell'ambito del direccionamento dei farmaci non possono prescindere dalla conoscenza dettagliata del destino biologico e la farmacocinetica di avidina, dei suoi derivati (liteavidina: la forma deglicosilata e neutraavidina: la forma chimicamente modificata con minor punto isoelettrico), nonché della streptavidina. Sono stati quindi intrapresi diversi studi nell'ambito dei quali si è anche cercato di mettere in relazione le caratteristiche chimico fisiche e composizionali dei diversi analoghi con le loro caratteristiche farmacocinetiche.

Quando avidina viene iniettata nel torrente circolatorio, essa viene eliminata rapidamente. Dopo 20 minuti si ritrova in circolo solo l'1% della dose iniettata. La maggior parte della dose che non viene eliminata immediatamente si ritrova nel fegato (circa il 10% della dose totale dopo 6h). La porzione glucidica non sembra avere un effetto significativo sulla farmacocinetica anche se i dati riportati a riguardo sono fra loro in parte contraddittori. In particolare, Yao (Yao, Zhang et al. 1998) sostiene che sia questa porzione che causa il tropismo per il fegato mentre i dati di Schechter non confermano questo dato (Schechter, Silberman et al. 1990).

Nemmeno l'elevata carica positiva sembra influire significativamente sulla farmacocinetica: neutraavidina possiede lo stesso profilo farmacocinetico dell'avidina, anche se si osserva una inferiore affinità per i reni. Quando la proteina viene pre-saturata con biotina, la sua farmacocinetica varia in parte: si ha una permanenza più lunga ed una maggiore ritenzione in alcuni organi, in particolare il cuore, fegato e reni. Questa diversità non si osserva nel caso della forma deglicosilata e sembra quindi essere legata ad una diversa esposizione della porzione zuccherina secondaria ai cambiamenti conformazionali indotti dalla presenza di biotina (Schechter, Silberman et al. 1990). Sembra quindi che la porzione zuccherina eserciti una azione solo quando viene esposta in un certo modo.

I risultati qui riportati si riferiscono a dati ottenuti nei topi. La rapida eliminazione potrebbe in parte essere legata alla presenza di anticorpi antiavidina. È noto infatti che nell'uomo, come probabilmente anche nel topo, anticorpi anti-avidina sono presenti come conseguenza della dieta. (Bubb, Green et al. 1993). La farmacocinetica di avidina migliora con l'introduzione sulla sua superficie di catene poliossietileniche (Caliceti, Chinol et al. 2002). La modifica con PEG non cambia la struttura terziaria e quaternaria di avidina ma ne diminuisce il riconoscimento anticorpale e ne aumenta significativamente l'emivita plasmatica proporzionalmente alla quantità e al peso

molecolare del PEG introdotto. Inoltre, all'aumentare del peso molecolare del coniugato, si osserva un incremento della cattura da parte di tumori solidi, probabilmente secondaria a fenomeni di EPR (*Enhance Permeation and Retention*) che generalmente si osservano nei siti tumorali (2.1.4.2).

Streptavidina possiede una farmacocinetica più lenta. Una percentuale variabile tra il 6 ed il 20% della dose iniettata si ritrova distribuita tra il torrente circolatorio e diversi organi dopo ancora 48h dall'iniezione, con un tropismo maggiore per il fegato in analogia a avidina, ma anche per i reni. La presaturazione con biotina non modifica in alcun modo la farmacocinetica, mentre si registra una significativa variabilità di comportamento tra lotti di diversa origine. Questo è legato al fatto che diverse preparazioni contengono percentuali diverse di un derivato parzialmente idrolizzato (streptavidina troncata), nel quale risultano mancanti 12-14 amminoacidi di posizione N terminale e 18 amminoacidi della porzione C terminale. La streptavidina troncata ha una farmacocinetica diversa da quella intera, rispetto alla quale mostra minore ritenzione in diversi tessuti ma tropismo renale molto più elevato. E' inoltre importante ricordare che nell'uomo non esistono anticorpi specifici già sviluppati contro streptavidina ma la proteina è altamente immunogenica per cui la farmacocinetica dopo ripetute somministrazioni e' molto più rapida.

3.3. NANOASSEMBLATI DI DNA E AVIDINA

3.3.1 Basi molecolari e caratteristiche

Recenti studi hanno evidenziato un'altra importante proprietà dell'avidina, quella cioè di legarsi al DNA mediante un'interazione ad elevata affinità (Morpurgo, Radu et al. 2004). L'affinità dell'avidina per il DNA non è semplicemente dovuta ad interazioni aspecifiche di tipo elettrostatico, bensì è il risultato di una interazione ad alta affinità che coinvolge specifiche regioni della proteina.

L'analisi della distribuzione aminoacidica sulla superficie dell'avidina derivata da dati cristallografici ha rivelato la presenza di una regione alla base del β -barrel dove sono localizzate un elevato numero (11) di lisine e arginine. E' probabile che esista una complementarità elettrostatica tra questa regione carica positivamente nell'avidina e i gruppi fosfato nel DNA. Oltre a questo ancoraggio elettrostatico sono coinvolti nella stabilizzazione del complesso anche legami a idrogeno e interazioni di Van der Waals che hanno come protagonisti altri residui all'interno della proteina (probabilmente le molte asparagine e glutammine e le sequenze thr-arg, arg-thr e arg-ser presenti tra il C

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

Indagini ultrastrutturali e al light scattering hanno dimostrato che secondariamente alle interazioni sopra citate l'avidina si autoassembla sul DNA in una maniera organizzata dando origine a delle nanoparticelle discrete (figura 6). Immagini ottenute con microscopio elettronico a trasmissione e analisi di light scattering dinamico, hanno rivelato che i complessi avidina-DNA assumono preferenzialmente una conformazione a bastoncino o toroidale, con una dimensione media di 50-100 nm. In questi assemblati, in cui il DNA risulta essere fortemente condensato, ciascuna avidina si lega a 18 ± 4 paia di basi. Forma e dimensioni del nanoassemblato variano a seconda del tipo e della lunghezza del DNA utilizzato. Con un plasmide circolare si favorisce la formazione di assemblati toroidali mentre usando plasmidi linearizzati si ottengono assemblati a bastoncino..

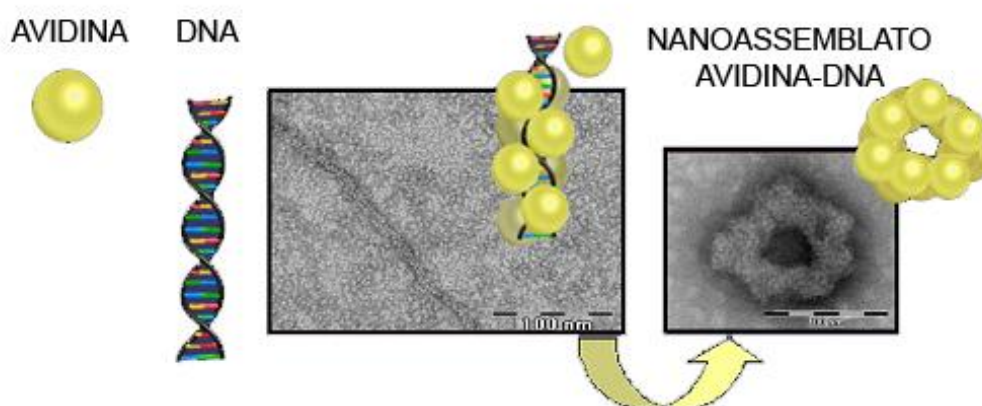


Figura 6 Rappresentazione schematica della formazione dei nanoassemblati avidina-DNA.

Questi complessi si sono dimostrati stabili ad elevate diluizioni ($[DNA] = 10pM$). La presenza di elettroliti in soluzione non destabilizza l'interazione fino ad una soglia di almeno 200 mM in NaCl oltre la quale le particelle iniziano a disassemblarsi. Gli elettroliti comunque, inducono un processo di aggregazione a seguito della modifica del potenziale ζ di superficie, per cui in condizioni fisiologiche non si osservano particelle discrete, ma macroaggregati.

L'aggregazione in soluzione e' un problema generale nel caso dei sistemi nanoparticellari. Il modo classico con il quale si cerca di prevenirla e' quello di ancorare

alla loro superficie polimeri idrofilici che ne modificano il potenziale e offrono una protezione di natura sterica all'aggregazione

Recentemente è stata messa a punto una tecnologia che permette di ottenere nanoassemblati stabili e discreti anche in presenza di sali (Morpurgo M. 2009), preservando la possibilità di sfruttare i siti di legame per la biotina liberi al fine di funzionalizzare le particelle con substrati biotinilati di varia natura.

Gli assemblati di avidina e DNA sono caratterizzati da relazioni stechiometriche ben definite. Ciò, unito alla loro stabilità in condizioni fisiologiche, alla modulabilità di forma e dimensioni e alla possibilità di derivatizzarle e funzionalizzarle mediante i siti di legame per la biotina costituisce un punto di partenza per un loro utilizzo pratico in campo medico e diagnostico.

3.3.2 Potenziali applicazioni dei nanoassemblati avidina-DNA

Le possibili applicazioni dei nanoassemblati avidina-DNA spaziano dalla immunodiagnostica in vitro, all'imaging in vivo e il drug delivery ricalcando quelle del sistema avidina-biotina classico. Avidina possiede un numero limitato (4) di siti di legame per la biotina. Un sistema costituito n unità di avidina stabilmente unite assieme permette di avere aumentare n volte la capacità di carico rispetto alla avidina in forma monomerica. I nanoassemblati avidina-DNA sembrano quindi degli ottimi candidati per un loro utilizzo come amplificatori molecolari in ambito diagnostico, come vettori per farmaci e, in generale, come *scaffold* molecolari per sistemi multifunzionali.

3.3.2.1 Diagnostica in vitro

Saggi bioanalitici sono routinariamente svolti in ambito medico e biologico trovando applicazione in citologia, in diagnostica medica e nel monitoraggio di farmaci e droghe da abuso. La concentrazione o la presenza di uno o più analiti, di natura endogena o esogena, in cellule, siero, plasma, urine o altri fluidi biologici viene determinata a concentrazioni che vanno dai microgrammi ai femtogrammi per millilitro (Dickson, Pollak et al. 1995). Una specifica molecola legante, come un anticorpo o un frammento di acido nucleico, è utilizzata per ottenere un selettivo riconoscimento dell'analita. Mediante svariate tecniche il legante viene marcato in modo da associare all'evento di riconoscimento lo sviluppo di uno specifico segnale. I sistemi di marcatura e rilevazione che vengono utilizzati in ambito immunodiagnostico si basano sull'assorbimento o emissione di radiazioni elettromagnetiche e includono metodi colorimetrici, fluorimetrici e radiochimici.

In tabella 4. sono elencati i limiti di sensibilità tipici di alcune tecniche immunodiagnostiche.

Tabella 4. Limiti di sensibilità in saggi immunodiagnostici

| Tipo di rivelazione | Limite di rivelabilità | Substrato | Riferimento |
|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Absorbance | 5×10^{-16} M | Tetramethyl benzidin | Kpl cathalog |
| Time resolved fluorecence | 3×10^{-17} M | Eu(III) terpyridine-bis-(methyleneamine)tetracetic acid | Saha et al., 1993 |
| Real Time Immuno PCR | 3×10^{-17} M | - | Adler et al, 2003 |
| Enhanced Chemifluorescence | 1×10^{-18} M | 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine | Pierce cathalog |
| Radiometric | 1×10^{-18} M | - | <i>Chikhaouiy et al, 1988</i> |
| Chemiluminescence | 5×10^{-19} M | Luminol | Kpl Cathlaog |

I nanoassemblati avidina-DNA, formati da centinaia di avidine per particella, permettono di associare a ciascun singolo evento di riconoscimento un numero molto elevato di molecole segnale. Sfruttando i nanoassemblati come amplificatori molecolari è quindi teoricamente possibile, a prescindere dal tipo di sistema di rivelazione utilizzato, andare a quantificare analiti a concentrazioni molto basse evitando di utilizzare tecniche particolarmente complesse, costose o che prevedono l'uso di radionuclidi.

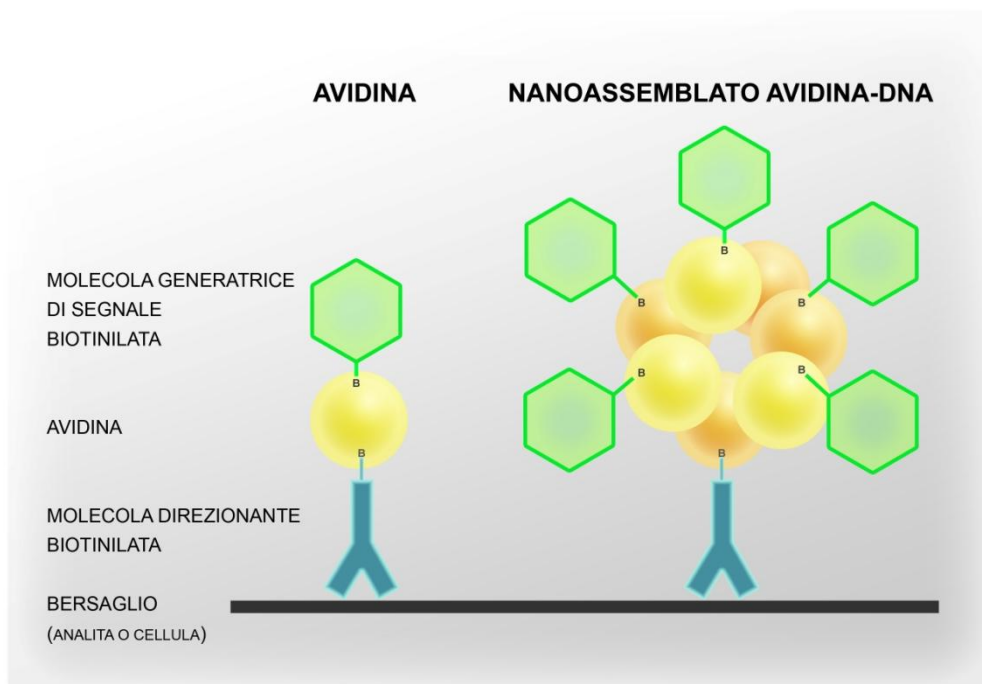


Figura 7. Rappresentazione schematica semplificata che descrive il meccanismo di amplificazione dei sistemi nanoassemblati poliavidinici rispetto ad avidina monomerică.

3.3.2.2 Imaging e direzionamento di farmaci in vivo

I nanoassemblati avidina-DNA racchiudono in un unico oggetto tutta una serie di caratteristiche che li rendono degli ottimi candidati quali vettori per il direzionamento, sia attivo che passivo, di farmaci e agenti traccianti *in vivo*. Queste nanoparticelle infatti:

- sono stabili in ambiente fisiologico;
- sono costituite da materiale biodegradabile e biocompatibile;
- sono funzionalizzabili in maniera stechiometricamente controllata a livello superficiale con una ampia varietà di molecole biotinilate;
- sono in grado di trasportare un elevato numero di farmaco o molecole segnale per particella;
- hanno dimensione adatta (100-130nm) sia per libera circolazione che per sfruttare effetto EPR (*enhanced permeation retention*) nel *targeting* passivo al tessuto tumorale;
- sono rivestite da polimeri idrofilici (nanoparticelle *stealth*) che ne mascherano la superficie favorendo una maggior emivita plasmatica;
- sono funzionalizzabili con agenti direzionanti per sfruttare *targeting* di tipo attivo.

4. MATERIALI E METODI

4.1. MATERIALI

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid)diammonium salt - ABTS- (Sigma A1888)

Alexa⁶⁸⁰-Carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen # A-20008)

Agarosio (Bio Rad Laboraories #161-3101)

Avidina (Belovo, Belgium)

Biotina (Fluka #14400)

Biotina-Alexa⁵⁴⁶ (Molecular Probes #A12923)

Biotina-PEG-C-OSu (Iris biotech GmbH # PEG1057)

Diamminobenzidina - DAB - (Sigma #D1.238-4)

Dimetilamminocinnamaldehyde (Sigma #051H1428)

DNA plasmidico p-EGFP 4,7 kbp (Clonotech #6084-1)

DNA *poly G·C* 7,2 Kbp (Sigma #P3136)

DNA *poly CG·GC* 1,3 Kbp (Sigma #P9389)

DNA genomico frammentato da *clostridium difficile* (Sigma #D1750)

Acido etilendiamminotetracetico - EDTA - (Sigma #03609)

Etidio bromuro (Sigma #46067)

IgG di capra(Prodotti Gianni Spa #CIPP40)

Acido 4-idrossiazobenzen-2-carbossilico - HABA - (Fluka #92822)

Horseradish Peroxidase, type VI - HRP - (Sigma #P6782)

Siero albumina bovina - BSA - (Sigma #D5905)

Tetrametilbenzidina - TMB - (Sigma #86036)

Acido trinitrobenzensolfonico - TNBSA - (Sigma # H5126)

Tris(idrossimetill)aminometano - TRIS - (Sigma #33742)

Gli oligonucleotidi sintetici a singola catena desalificati (A8, T8, C8 e G8; A16, T16, C16 e G16) sono stati forniti dalla ditta M-Medical Eurofins MWG Operon (Eberserg, Germany).

Gli oligonucleotidi sintetici a singola catena HPLC purificati A8, T8, C8 e G8 sono stati gentilmente forniti da M. Wilchek e dal servizio di DNA *synthesis* del "Weizmann Institute of Science", in Israele.

Tutti gli altri reagenti utilizzati sono stati forniti da Sigma-Aldrich (St. Louis - Missouri, United States).

I solventi utilizzati sono stati forniti da Carlo Erba reagenti. L'acqua utilizzata negli esperimenti è di grado ultrapuro milliQ.

ABBREVIAZIONI UTILIZZATE

BSA: albumina sierica bovina
BBS: sito di legame per la biotina (*biotin binding site*)
DAB: diamminobenzidina
DBS: sito di legame per il DNA (*DNA binding site*)
DMSO: dimetilsolfossido
EMSA: saggio di variazione di mobilità elettroforetica (*electrophoretic mobility shift assay*)
HABA: acido 4-idrossiazobenzen-2-carbossilico
PBS: tampone fosfato 10mM, sodio cloruro 150mM, pH 7,4
PBST: tampone fosfato 10mM, sodio cloruro 150mM tween20 0,05%, pH 7,4
TEA: trietilammina
TBE: tampone TRIS 89mM mM, borato 89 mM, EDTA 2mM mM, pH 8,0
TNBSA: acido trinitrobenzensolfonico
TRIS: tris(idrossimetil)amminometano
TFA: acido trifluoroacetico

4.2. STRUMENTAZIONE

Le analisi spettroscopiche sono state effettuate utilizzando uno spettrometro Varian Cary 50 UV-Vis. L'HPLC utilizzato è uno strumento Agilent 1200, dotato di rivelatore diodi array UV/VIS. La fluorescenza è stata misurata mediante un fluorimetro JASCO-FP 6500 dotato di cella termostata e di agitatore magnetico. Le analisi di Light Scattering Dinamico (DLS) sono state eseguite con uno strumento Zetasizer Nano S (Malvern, Orsay-Francia) che effettua misure in back scattering (NIBS). Il microscopio ottico utilizzato è uno strumento Leica Leitz DM IRB con fotocamera Nikon; gli obiettivi usati per l'ingrandimento sono stati 5X, 10X, 20X e 40X.

Per l'acquisizione delle immagini dei gel di agarosio è stato utilizzato un transilluminatore Gel doc XR (Bio Rad Laboratories, Hercules-United States). Le immagini di fluorescenza in vivo sono state acquisite utilizzando uno strumento eXplore Optix (GE Medical System, London-Ontario). I saggi ELISA sono stati effettuati utilizzando un lettore di micro piastre Multiskan FC (Thermo Scientific), un agitatore per micro piastre termostato e un lavatore per micropiastre automatico Wellwash MK2 (Thermo Scientific).

4.3. PROCEDIMENTI GENERALI

4.3.1. Determinazione della concentrazione di DNA in soluzione

4.3.1.a. Metodo per UV

La concentrazione di DNA in soluzione, in assenza di ulteriori cromofori, viene determinata attraverso la sua assorbanza tra 260 e 280 nm, sulla base della sua composizione nucleotidica e dei valori di ϵ molare delle singole basi.

Per il DNA plasmidico, per i DNA a lunga catena poly G-C ,poly CG·GC e genomico si e' utilizzato il valore di assorbività medio a 1 mg/ml pari a 20. Per i diversi oligonucleotidi a singola catena sono invece stati impiegati i valori di assorbività descritti nella tabella 5.

Tabella 5. I diversi oligonucleotidi sintetici utilizzati e i valori di assorbività molare utilizzati per determinarne la concentrazione.

| sequenza | Lambda (λ) max (nm) | Epsilon (ϵ) (mM) |
|------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| AAAAAAAA | 259 | 123,2 |
| TTTTTTTT | 267 | 76,8 |
| GGGGGGGG | 252 | 109,6 |
| CCCCCCCC | 271 | 72,8 |
| AAAAAAAAAAAAAAAA | 259 | 246,4 |
| TTTTTTTTTTTTTTTT | 267 | 153,6 |
| GGGGGGGGGGGGGGGG | 252 | 219,2 |
| CCCCCCCCCCCCCCCC | 271 | 145,6 |

4.3.1.b. Metodo per fluorescenza in gel di agarosio

Questo metodo è stato adottato per determinare la concentrazione del DNA plasmidico quando in soluzione erano presenti altre sostanze che assorbono tra 260 e 280 nm, rendendo impossibile la quantificazione attraverso l'analisi UV.

In questo metodo i campioni contenenti DNA vengono addizionati con 0,17 volumi di blu di bromofenolo 0,2 % in acqua/glicerolo 50:50 quindi 30 μ l della miscela ottenuta vengono caricati su gel di agarosio allo 0,8 %, contenente etidio bromuro allo 0,05 % e immerso in tampone tris 89 mM, borato 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0 (TBE). I gel

vengono fatti correre per 90 minuti sotto una tensione di 70 mV. Le immagini vengono acquisite con un transilluminatore UV, ponendo attenzione a non sovrapporre il segnale per consentire l'analisi quantitativa della fluorescenza; quest'ultima è stata effettuata utilizzando il *software Image J*. La concentrazione di DNA in un campione incognito viene determinata confrontando la sua fluorescenza con una retta di taratura ottenuta caricando nel gel soluzioni a concentrazione nota dello stesso DNA. Tale analisi consente di ottenere una linearità tra la quantità di DNA plasmidico caricato e l'intensità del segnale rilevato con il transilluminatore tra 15 e 75 ng ca (0,75 e 3,75 µg/ml). Questo metodo consente inoltre di distinguere il DNA legato all'avidina da quello non legato, sulla base della diversa mobilità nel gel di agarosio (vedi paragrafo 4.3.2.).

4.3.2. Determinazione della mobilità elettroforetica del DNA (gel di agarosio)

Questo metodica misura la mobilità del DNA in un gel di agarosio, quando questo viene sottoposto ad una campo elettrico. Il DNA, carico negativamente, si muove verso l'anodo dello strumento con una velocità che dipende dalla sua dimensione e dalla sua carica (oltre che dal grado di reticolazione del gel di agarosio). Questa metodica viene comunemente utilizzata per determinare la dimensione di frammenti di DNA e/o plasmidi, oppure per valutare la capacità da parte di molecole diverse di interagire con il DNA, modificandone la mobilità a seguito di un cambiamento di carica o di dimensione.

In un tipico esperimento, le soluzioni di DNA vengono miscelate con 1/6 di loading buffer 6X e la miscela viene caricata sul gel di agarosio preventivamente preparato, raffreddato ed immerso in tampone TBE. A fine corsa, i geli vengono analizzati tramite un transilluminatore UV, attraverso il quale vengono acquisite immagini digitali, regolando il tempo di acquisizione in modo tale da non sovrapporre il segnale e consentire quindi l'analisi quantitativa della fluorescenza. L'analisi quantitativa delle immagini è stata effettuata utilizzando il *software Image J*. In questa tesi abbiamo sempre impiegato geli di agarosio allo 0,8 % (p/v), gelificati in tampone TBE pH 8.0, in presenza di bromuro di etidio allo 0,05 %. La durata di una corsa elettroforetica è di 90 minuti sotto una tensione di 70 mV.

4.3.3. Determinazione della concentrazione di avidina in soluzione

4.3.3.a Metodo per UV

La concentrazione di avidina in soluzione, in assenza di ulteriori cromofori, viene determinata attraverso la sua assorbanza a 280 nm, sulla base della sua ϵ 1%1cm pari a 1,54.

I metodi descritti di seguito consentono invece di determinare la concentrazione dell'avidina quando in soluzione sono presenti altre sostanze che assorbono tra 260 e 280 nm, come ad esempio gli acidi nucleici.

4.3.3.b Metodo per fluorescenza utilizzando biotina-Alexa

Data l'elevata costante di affinità tra biotina e avidina, quando un derivato di biotina viene aggiunto ad una soluzione di avidina in quantità stechiometricamente inferiori rispetto ai siti di legame disponibili, esso si lega in modo quantitativo e irreversibile alla proteina. Di conseguenza, aggiungendo all'avidina un derivato di biotina legato ad un fluoroforo, la proteina stessa diventerà fluorescente e sarà quantificabile in soluzione in modo indiretto, andando a quantificare il fluoroforo ad essa legato. Nel nostro caso, abbiamo usato il derivato biotina-Alexa⁵⁴⁶ (Molecular Probes #A12923), dove la biotina risulta legata ad un fluoroforo di ultima generazione dotato di elevata risposta quantica di fluorescenza.

Per queste indagini è stato preparato uno *stock* di avidina fluorescente, previa saturazione con biotina-Alexa⁵⁴⁶ del 4 % dei siti di legame per la biotina. Questa soluzione è stata usata per condurre esperimenti di *binding* con DNA plasmidico (vedi paragrafo 2.3.). In questi esperimenti la concentrazione di avidina è stata determinata confrontando la fluorescenza del campione a titolo incognito con una retta di calibrazione misurata in parallelo. Preliminarmente è stato verificato che, nell'intervallo di concentrazioni testate (da 1 $\mu\text{g/ml}$ a 8 $\mu\text{g/ml}$), la relazione tra la concentrazione di avidina nel campione e la sua fluorescenza segue un andamento lineare.

Le letture al fluorimetro sono state effettuate su campioni diluiti a 2 ml, utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 556 nm (ampiezza banda di eccitazione = 5 nm) e una lunghezza d'onda di emissione pari a 573 nm (ampiezza banda di emissione = 10 nm).

Questo metodo per fluorescenza non consente di distinguere tra l'avidina libera e quella legata ad un acido nucleico.

4.3.3.c Metodo per HPLC

La concentrazione di avidina libera è stata ricavata dall'area del picco ad un tempo di ritenzione di 16,2 minuti sulla base di una retta di taratura ottenuta iniettando soluzioni di avidina a concentrazione nota (1, 2, 3 e 4 µg/loop 20 o 500 µl). Le analisi sono state effettuate mediante HPLC a fase inversa, utilizzando una colonna Jupiter C18 250 x 4,6 mm, flusso 1ml/min, con una fase mobile costituita da A: acqua e TFA 0,05 %; B: ACN 95 % , acqua 5 % e TFA 0,05 % e con un gradiente di eluizione riportato nella tabella 6.

Tabella 6. Gradiente di eluizione per l'analisi in RP-HPLC

| tempo | % B |
|-------|-----|
| 0' | 0 |
| 3' | 0 |
| 23' | 80 |
| 24' | 100 |
| 25' | 100 |
| 27' | 0 |

Come rivelatore è stato utilizzato un *Diode Array Detector* (DAD) a 220 nm di lunghezza d'onda. E' stata verificata la correlazione lineare tra l'area del picco e la concentrazione della proteina, nel *range* da 0 µg/ml a 200 µg/ml.

Diversamente dal metodo per fluorescenza (2.2.2.b), questo consente di distinguere tra l'avidina libera e quella legata ad un acido nucleico.

4.3.4. Analisi dimensionale e morfologica di complessi avidina-DNA in soluzione

4.3.4.a. Analisi qualitativa per UV

Questa analisi è stata effettuata su miscele di acidi nucleici e avidina per valutare in modo qualitativo l'eventuale presenza di aggregati di dimensioni dello stesso ordine di grandezza della luce UV-Vis. A questo scopo sono stati registrati gli spettri di assorbimento nel *range* di lunghezze d'onda tra 200 e 800 nm. Tali spettri sono stati confrontati con gli spettri teorici ottenuti sommando matematicamente gli spettri di assorbimento della proteina e dell'acido nucleico in soluzione da soli e alle stesse concentrazioni di quelle presenti nelle miscele in esame. Quando la somma matematica degli spettri di avidina e acido nucleico ha una assorbività inferiore a quella della miscela, si presume che si siano formati aggregati, responsabili di *scattering* della luce.

4.3.4.b. Determinazione della dimensione di particelle in soluzione via *Dynamic Light Scattering* (DLS)

Le analisi sono state effettuate a 25°C, utilizzando lo strumento Zetasizer nano S (Malvern). I campioni sono stati analizzati in cuvette di polistirene o di quarzo nel volume minimo richiesto dallo strumento (300 µl). Prima di ciascuna analisi lo strumento è stato impostato con i dati relativi a: i valori di viscosità (0,8871) e indice di rifrazione (1,330) del mezzo (considerando quest'ultimo acqua), l'indice di rifrazione del campione analizzato (1,45), la temperatura (20°C), il numero di ripetizioni per ciascuna analisi (2) e il tipo di cuvetta (quarzo o polistirene).

Il limite strumentale per questo tipo di analisi è stato individuato in via preliminare effettuando misure su soluzioni di avidina (la "particella" più piccola di interesse per la tesi) e avidina-biotina a concentrazione calante da 50 µg/ml a 9,4 µg/ml (in tris 50 mM, pH 7.4). Lo strumento ha fornito risultati attendibili e riproducibili fino alle concentrazioni di 18,7 µg/ml e 50 µg/ml, rispettivamente per avidina-biotina e avidina.

4.3.4.c. Analisi al microscopio ottico

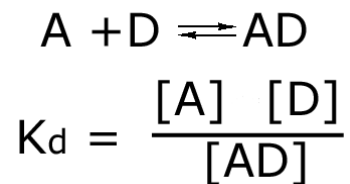
Queste analisi sono state effettuate per verificare, quando possibile, l'eventuale forma degli aggregati di grosse dimensioni formatasi durante le titolazioni di avidina con DNA (vedi paragrafo 4.4.1.). Le analisi sono state effettuate su di un *pool* limitato di campioni. Una goccia della sospensione è stata posta sul vetrino e coperta con un vetrino coprioggetto, quindi analizzata al microscopio in contrasto di fase con i seguenti obiettivi: 5X, 10X, 20X e 40X. L'elenco dei campioni analizzati è riportato in tabella 7.

Tabella 7. Campioni analizzati mediante microscopia ottica

| nome del campione | singolo o doppio filamento |
|--------------------|-------------------------------|
| Avidina+G16-C16 | doppio filamento |
| Avidina+G16 | singolo filamento |
| Avidina+A16 | singolo filamento |
| Avidina+T8 | singolo filamento |
| Avidina+A8 | singolo filamento |
| Avidina+G8 | singolo filamento |
| Avidina+C8 | singolo filamento |
| Avidina-biotina+T8 | singolo filamento |
| Avidina-biotina+C8 | singolo filamento |
| Avidina-biotina+A8 | singolo filamento |
| Avidina-biotina+G8 | singolo filamento |

4.4. STUDI DI INTERAZIONE TRA AVIDINA E DNA A LUNGA CATENA

L'avidina interagisce con il DNA mediante un'interazione ad elevata affinità, ma nulla è noto per quanto riguarda la forza di interazione e la stechiometria del legame. Sono state quindi condotte una serie di indagini preliminari per valutare in prima approssimazione la forza di questa interazione. A questo scopo è stata presa come punto di partenza la forma più semplice di interazione tra un ligando ed un recettore, che avviene quando entrambi interagiscono attraverso un unico sito di legame. Questa situazione viene descritta con la seguente equazione di equilibrio termodinamico:



dove A e D costituiscono i due elementi interagenti e AD e' il complesso che si forma. Con il fine di determinare la costante di dissociazione K_d , in questo contesto è stato definito come "A" l'avidina libera, come "D" il suo sito di *binding* sul DNA e con "AD" il complesso costituito da una avidina legata ad un sito di binding sul DNA.

Sono state quindi ottenute più soluzioni miscelando fra loro avidina e il plasmide p-EGFP in rapporti molarli diversi. Sono poi stati determinate le concentrazioni di avidina libera A, complesso AD, e DNA libero D, utilizzando le metodiche descritte sopra (4.2.1. - 4.2.2. - 4.2.3.).

In particolare la concentrazione di avidina totale in soluzione è stata ricavata mediante analisi di fluorescenza, la concentrazione di avidina libera non assemblata al DNA è stata ricavata mediante cromatografia RP-HPLC, le concentrazioni di DNA libero e legato alla proteina sono state determinate mediante tecniche elettroforetiche su gel di agarosio.

4.4.1. Stechiometria dell'interazione avidina-plasmide in acqua e tampone via HPLC

Gli esperimenti di seguito riportati sono stati eseguiti in due tamponi differenti, acqua e PBS, per valutare in che modo la presenza di ioni interferisce nel legame tra la proteina e il DNA. Sono stati miscelati, sotto agitazione, pari volumi di soluzioni di avidina e di DNA plasmidico a concentrazione variabile (40 μ l + 40 μ l). La concentrazione iniziale di avidina nel volume di 40 μ l è stata mantenuta costante in tutti i campioni (332,5 μ g/ml, $9,9 \times 10^{-6}$ M), mentre è stata variata la concentrazione di DNA da 77 μ g/ml a 230 μ g/ml

([bp]= da $1,2 \times 10^{-4}$ M a $3,5 \times 10^{-4}$ M) al fine di ottenere i rapporti desiderati tra le cariche positive e le cariche negative (+/-). Questo rapporto è compreso tra 1,2 e 0,4 e corrisponde ad un rapporto moli di paia di basi/moli di avidina che varia da 11,7 a 35. Per il calcolo del rapporto tra le cariche è stato utilizzato un valore di 2385 come peso medio corrispondente ad una carica positiva nell'avidina (ogni subunità di avidina pesa 16000 Da, ed è costituita da una parte proteica per 14315 Da ed una zuccherina; la parte proteica ha un delta di carica positiva pari a +6, dato dal bilanciamento degli amminoacidi basici e quelli acidi) e un valore di 330 come peso medio corrispondente ad una carica negativa del DNA. I campioni sono stati tenuti per 60 minuti a temperatura ambiente e centrifugati a 16000 g, per 3 minuti, 4°C; la concentrazione di avidina libera presente nel surnatante è stata ricavata mediante analisi RP-HPLC iniettando il campione a loop (20 µl) pieno.

4.4.2. Determinazione Kd avidina-DNA plasmidico

Sono stati mescolati sotto agitazione volumi uguali (250µl + 250µl) di avidina 4% Biotina-Alexa alla concentrazione di 26,6 µg/ml e DNA plasmidico p-EGFP 6,2 µg/ml o 4,6 µg/ml in Tris 0,1 M ottenendo assemblati avidina/DNA aventi rispettivamente rapporto +/- 0,6 o +/- 0,8. Dopo 30 minuti in bagno di ghiaccio, le soluzioni sono state centrifugate per 5 minuti (15000 rpm, 16000 g, 4° C) e 450 µl di surnatante sono stati prelevati e messi da parte, mentre il precipitato è stato ripreso con 100 µl di NaCl 0,3 M.

Le concentrazioni di avidina totale ([AD]+ [A]) e avidina libera ([A]) nel surnatante sono state quantificate rispettivamente mediante fluorescenza e RP-HPLC (*loop* 500 µl) come descritto nei paragrafi 2.3.3.b e 2.3.3.c. Dalla differenza tra i due valori è stata determinata [AD].

Il DNA totale presente in soluzione nel surnatante ([D] + [AD]) è stato determinato mediante elettroforesi su gel di agarosio come descritto nel paragrafo 4.2.1.b. La concentrazione del DNA libero ([D]) è stato calcolato dalla quantità di DNA totale sottratto dal valore di [AD] determinato come sopra descritto.

Il calcolo di [AD] e [D] presuppone però la conoscenza esatta della dimensione del sito di legame dell'avidina sull'acido nucleico [DBS]. Poiché tale la dimensione non è nota con esattezza ma solo in via approssimata, sono state effettuate più proiezioni matematiche, ipotizzando una dimensione variabile tra 14 e 22 paia di basi. Le diverse concentrazioni ottenute sono state immesse nell'equazione 1 da cui è stata ricavata la costante Kd. Sono stati ottenuti più valori di Kd a seconda della dimensione del sito di

legame dell'avidina sul DNA ipotizzato. Poiché gli stessi conti sono stati effettuati su più punti sperimentali, la selezione del valore di K_d più probabile e della relativa dimensione del sito di legame è stata fatta valutando la deviazione standard percentuale dei diversi valori ottenuti per ciascun DBS.

I risultati ottenuti sono stati incrociati con quelli ricavati nel paragrafo 4.3.1.

4.4.3. Diversa affinità per DNA a diversa sequenza via *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)

Sono stati effettuati saggi di mobilità elettroforetica in gel di agarosio, al fine di valutare l'affinità di legame tra avidina e acidi nucleici con sequenze differenti. In particolare sono stati testati tre acidi nucleici a doppio filamento: DNA lineare poly G·C (7,2 Kbp), DNA lineare poly CG·GC (1,3 Kbp) e DNA plasmidico p-EGFP (4,7 Kbp).

Volumi uguali di avidina e DNA (30 μ l + 30 μ l) diluiti in PBS sono stati mescolati sotto agitazione. La concentrazione di DNA è stata mantenuta costante in tutti i campioni (6,25 μ g/ml finali; [bp]= $9,47 \times 10^{-6}$ M), mentre la concentrazione di avidina è stata variata tra 90 μ g/ml e 0 μ g/ml al fine di ottenere il rapporto desiderato tra le cariche positive e le cariche negative (+/-), compreso tra 1 e 0 che corrisponde ad un rapporto in moli di paia di basi/moli di avidina che varia da 14 a infinito. I campioni sono stati tenuti per 60 minuti a temperatura ambiente, addizionati di 10 μ l di loading buffer 6X; quindi 30 μ l della miscela ottenuta sono stati caricati su gel di agarosio e analizzati come descritto nel paragrafo 4.2.1.b.

4.4.4. Effetto del PEG sull'interazione avidina-DNA plasmidico

4.4.4.a PEG-ilazione covalente di avidina

Sono stati preparati 4 diversi coniugati avidina-mPEG mescolando una soluzione 10 mg/ml di proteina in tampone borato 0,1 M a pH 8 con differenti quantitativi di monometossi polietilenglicole N-idrossisuccinimidilestere (PEG-NHS). Il peso molecolare del polimero utilizzato è pari a 5KDa, il rapporto molare tra polimero e proteina impiegato nelle miscele di reazione è pari a 10,20,40 e 80 (rispettivamente 7,8 mg, 15,6 mg, 31,3 mg e 62,5 mg di PEG per ogni ml di soluzione di avidina). Ciascuna soluzione è stata mescolata per 2 ore a temperatura ambiente quindi i prodotti sono stati purificati dal polimero non covalentemente legato alla proteina mediante ultrafiltrazione usando una membrana in polietereolfone (cut-off 30KDa). La concentrazione di proteina nel prodotto finale è stata determinata mediante misure di assorbimento UV (paragrafo 2.3.3.a). Il numero medio di catene di PEG legate ad

avidina è stato determinato mediante il saggio colorimetrico (Habeeb 1966) e il saggio con iodio (Veronese and Morpurgo 1999). Le proprietà dei coniugati sintetizzati sono riportate in tabella 8.

Tabella 8. Proprietà dei coniugati mPEG5000-avidina sintetizzati.

| mPEG : avidina (rapporto molare in reazione) | mPEG : AVIDINA (rapporto molare nel prodotto) |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 10 | 0,9 |
| 20 | 1,2 |
| 40 | 2,1 |
| 80 | 3,6 |

4.4.4.b PEG-ilazione di avidina mediante complesso con biotina-mPEG

Le avidine PEG-ilate sono state ottenute a sfruttando l'interazione ad elevata affinità tra avidina e ligandi biotinilati. In particolare, avidina è stata disciolta in tampone PBS e differenti quantità di biotina-mPEG sono stati aggiunti al fine di ottenere il rapporto PEG : avidina desiderato. E' stato assunto che tutti residui biotinilati aggiunti alla soluzione sono stabilmente legati alla proteina.

4.4.4.c Affinità per DNA di avidina e suoi derivati PEG-ilati via *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)*

Sono stati effettuati saggi di mobilità elettroforetica in gel di agarosio, al fine di valutare l'affinità di legame tra il DNA plasmidico p-EGFP e derivati PEG-ilati di avidina. In particolare sono stati testati i derivati elencati in tabella 16 (vedi paragrafo 5.1.5i). Volumi uguali di proteina e DNA (30 μ l + 30 μ l) diluiti in PBS sono stati mescolati sotto agitazione. La concentrazione di DNA è stata mantenuta costante in tutti i campioni (6,25 μ g/ml finali; [bp]= $9,47 \times 10^{-6}$ M), mentre la concentrazione di proteina è stata variata tra 90 μ g/ml e 0 μ g/ml al fine di ottenere il rapporto desiderato tra le cariche positive e le cariche negative (+/-), compreso tra 1 e 0. I campioni sono stati tenuti per 60 minuti a temperatura ambiente, addizionati di 10 μ l di loading buffer 6X; quindi 30 μ l della miscela ottenuta sono stati caricati su gel di agarosio e analizzati come descritto nel paragrafo 2.2.1.b.

4.5. STUDI DI INTERAZIONE CON OLIGOMERI DI DNA

Lo scopo di questo studio di interazione è stato quello di determinare con precisione la costante di dissociazione K_d , l'eventuale presenza di più siti di *binding* sulla proteina e valutare in via preliminare se può esistere specificità per una sequenza nucleotidica in particolare.

4.5.1 Studi di legame attraverso la variazione di fluorescenza del triptofano di avidina

Sono stati effettuati esperimenti di fluorescenza utilizzando diverse sequenze di oligonucleotidi ed andando a valutare il cambiamento del segnale di fluorescenza del triptofano dell'avidina in seguito all'aggiunta degli oligomeri. Le indagini sono state condotte titolando soluzioni di avidina a concentrazione di 25, 10 o 5 $\mu\text{g/ml}$, in tampone tris 50 mM ed EDTA 1 mM con quantità crescenti di oligomeri di DNA; la titolazione è avvenuta aggiungendo volumi crescenti di oligomero (da stock 21,8 μM o 43,6 μM) alla soluzione di avidina (2 ml), in ambiente termostato a 25° C. Lo spettro di fluorescenza della proteina (λ di eccitazione 295 nm, λ di emissione 300-500 nm, *slit* 5 nm) è stato registrato prima dell'aggiunta dell'oligomero e dopo ciascuna aggiunta (15-20 aggiunte per titolazione, in volumi variabili tra 2 e 100 μl). Ogni spettro è stato registrato dopo aver mescolato la miscela con un ancoretta magnetica per un minuto, aspettando circa dieci secondi tra la fine dell'agitazione e l'analisi.

Ad una concentrazione di 25 $\mu\text{g/ml}$ di proteina il massimo di fluorescenza (338 nm) è pari a 800 unità; a fine titolazione quando si arriva a saturazione, il segnale di fluorescenza arriva ad un minimo di 250-400 unità di fluorescenza, valore che dipende dalla sequenza in esame.

Per il calcolo della costante i valori di fluorescenza sono stati normalizzati tenendo conto della diluizione e del *bleaching*; per quest'ultimo è stata valutata, in ciascun esperimento, la diminuzione del segnale di fluorescenza dell'avidina, alla stessa concentrazione e nel medesimo tampone, in seguito a successive irradiazioni. I valori normalizzati sono stati fittati mediante *Sigma Plot* assumendo che l'avidina abbia uno o due siti di legame per il DNA. Tra i valori restituiti dal programma, sono stati selezionati quelli caratterizzati dal migliore indice di correlazione ($R^2 > 0,99$).

Gli esperimenti sono stati condotti sia in presenza che in assenza di biotina, per valutare se in sua presenza aumenta l'affinità per gli oligomeri, come osservato con il DNA plasmidico (Morpurgo; Radu et al. 2004). In presenza di biotina il valore massimo

di fluorescenza a 25 µg/ml è inferiore a quello dell'avidina da sola (circa 550 unità di fluorescenza) ed è spostato ad una lunghezza d'onda di emissione minore (328 nm). Gli oligomeri analizzati e le loro concentrazioni sono riportati nella tabella 9 di seguito riportata.

Tabella 9. Elenco dei campioni analizzati per fluorescenza

| nome del campione | sequenza oligonucleotidica |
|--------------------------|--------------------------------------|
| A8 singolo filamento | AAAAAAAA |
| G8 singolo filamento | GGGGGGGG |
| C8 singolo filamento | CCCCCCCC |
| T8 singolo filamento | TTTTTTTT |
| A16 singolo filamento | AAAAAAAAAAAAAAAA |
| G16 singolo filamento | GGGGGGGGGGGGGGGG |
| C16 singolo filamento | CCCCCCCCCCCCCCCC |
| T16 singolo filamento | TTTTTTTTTTTTTTTT |
| C16-G16 doppio filamento | CCCCCCCCCCCCCCCC GGGGGGGGGGGGGGGG |

4.5.2. Misura di fenomeni di aggregazione

I campioni di avidina/oligomero provenienti dalla titolazione in fluorescenza sono stati analizzati mediante spettrofotometro UV-Vis (4.2.4.a), *Dynamic Light Scattering* (4.2.4.b) e, in alcuni casi, al microscopio ottico (4.2.4.c). Per l'analisi in DLS, le soluzioni sono state analizzate tali e quali e dopo essere state centrifugate per 5 minuti, a 7400 g e alla temperatura di 4°C. Le soluzioni sono quindi state poste in una cuvetta di quarzo e termostate ad una temperatura di 25°C durante l'analisi (tempo di equilibrio 2 minuti). In parallelo e come controllo sono stati analizzati campioni costituiti da sola avidina, avidina-biotina e solo l'oligonucleotide nel medesimo tampone e nelle stesse concentrazioni.

4.6 BIOTINILAZIONE DI AGENTI DIREZIONANTI, MOLECOLE SEGNALE, ATTIVITÀ ENZIMATICHE

4.6.1 Biotinilazione di IgG

IgG di capra disciolte in 10mM fosfato, 150mM NaCl, pH7,4 (PBS) ad una concentrazione di 3 mg/ml sono state aggiunte di acido biotinamidocaproico

succinimidilestere 5 mg/ml in DMSO anidro. La reazione è fatta avvenire a temperatura ambiente sotto blanda agitazione per un'ora ad un rapporto molare tra biotina e IgG pari a 1,5. Il prodotto è stato purificato da molecole a basso peso molecolare mediante gel filtrazione utilizzando una resina Sephadex G25. Il grado di biotilazione nel prodotto finale è stato determinato mediante saggio colorimetrico "HABA" (Green 1965) dopo digestione con tripsina. Il rapporto molare tra biotina e IgG nel prodotto finale è risultato pari a 1,3.

4.6.2 Biotin-PEG-ilazione di perossidasi

Ad una soluzione 1 mg/ml di perossidasi isotipo VI (HRP) in tampone borato 100mM pH 8,0 è stata aggiunta una quantità di biotina-PEG-OSu (5KDa) in modo da ottenere un rapporto tra biotina-PEG e HRP in reazione pari a 10. La soluzione è quindi stata lasciata per un'ora a temperatura ambiente sotto blanda agitazione. Il prodotto è stato purificato mediante ultrafiltrazione utilizzando una membrana filtrante in polietereolfone (MWCO = 30KDa). La concentrazione di HRP nella soluzione finale è stata determinata mediante misure di assorbimento UV-VIS ($E_{0,1\%}$ a 403 nm = 2,5). Il numero medio di catene di biotina-PEG legate a ciascuna proteina è stato determinato sia mediante il saggio colorimetrico "HABA" (Green 1965), sia mediante saggio con iodio (Veronese and Morpurgo 1999) effettuato utilizzando curve di calibrazione ottenute con il polimero corrispondente. Il rapporto molare tra biotina-PEG e proteina nel prodotto finale è risultato pari a 1,2.

4.6.3 Biotin-PEG-ilazione di IgG

Ad una soluzione 1 mg/ml di IgG in tampone PBS, è stata aggiunta una quantità di biotina-PEG-OSu (5KDa) tale da ottenere un rapporto tra biotina-PEG e HRP in reazione pari a 10. La soluzione è quindi lasciata per un'ora a temperatura ambiente sotto blanda agitazione. Il prodotto è purificato mediante ultrafiltrazione utilizzando una membrana filtrante in cellulosa rigenerata (MWCO = 100KDa). La concentrazione di IgG nella soluzione finale è stata determinata mediante misure di assorbimento UV-VIS ($E_{0,1\%}$ a 280 nm = 1,4). Il numero medio di catene di biotina-PEG legate a ciascuna proteina è stato determinato sia mediante il saggio colorimetrico "HABA" (Green 1965), sia mediante saggio con iodio (Veronese and Morpurgo 1999) effettuato utilizzando curve di calibrazione ottenute con il polimero corrispondente. Il rapporto molare tra biotina-PEG e proteina nel prodotto finale è risultato pari a 2,9.

4.6.4 Altri derivati biotinilati

Altri reattivi biotinilati utilizzati in questa tesi per la funzionalizzazione dei nanoassemblati avidina-DNA sono: biotina-mPEG₅₀₀₀ e biotina-(PEG₅₀₀₀)₂. Questi composti, la cui struttura è riportata in figura 8, sono stati utilizzati per funzionalizzare la superficie dei nanoassemblati al fine di prevenirne l'aggregazione in soluzioni caratterizzate da condizioni di forza ionica fisiologiche.

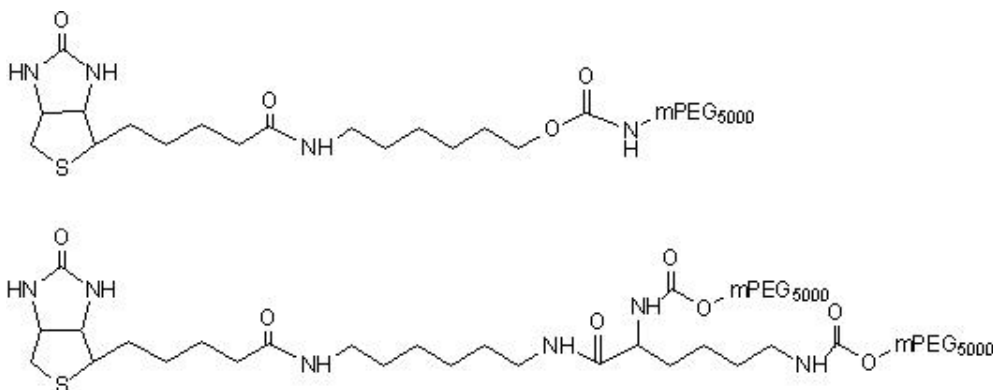


Figura 8. Struttura dei due derivati biotinilati di monometossipoli(etilenglicole) (biotina-mPEG₅₀₀₀ in alto e biotina-(PEG₅₀₀₀)₂ in basso) utilizzati per funzionalizzare la superficie dei nanoassemblati avidina-DNA al fine di prevenirne l'aggregazione in soluzioni tamponate.

Nelle varie formulazioni di nanoassemblati descritti in questa tesi quantità di volta in volta indicate di questi composti sono state aggiunte alle nanoparticelle in maniera da saturare la percentuale dei siti di legame per la biotina desiderata.

4.7. NANOASSEMBLATI AVIDINA-DNA

4.7.1. Preparazione dei nanoassemblati avidina-DNA

Le nanoparticelle vengono assemblate mescolando, sotto agitazione, pari volumi di soluzioni di avidina e di DNA, entrambe in acqua. La miscela viene mantenuta sotto agitazione per circa un minuto ed è quindi mantenuta in ghiaccio o a 4°C fino a successiva analisi o manipolazione. Nell'ambito di questa sono stati utilizzati due tipi di acido nucleico: DNA plasmidico circolare lungo 4700 paia di basi o DNA genomico frammentato lungo 24000 paia di basi. Gli assemblati sono stati ottenuti a diversi rapporti di carica (+/-) ed impiegando diverse concentrazioni di reattivi. Per il calcolo del rapporto di carica è stato utilizzato un valore di 2385 come peso medio

corrispondente ad una carica positiva nell'avidina e un valore di 330 come peso medio corrispondente ad una carica negativa nel DNA.

4.7.2. Funzionalizzazione dei nanoassemblati mediante i siti di legame per la biotina

Successivamente alla loro preparazione i nanoassemblati sono stati funzionalizzati saturando una porzione dei siti di legame per la biotina con derivati biotinilati. Ad una soluzione di nanoassemblati viene aggiunta la quantità desiderata di prodotto biotinilato, assumendo che il totale del materiale biotinilato aggiunto rimane legato ai nanoassemblati almeno fino alla totale saturazione dei siti nella proteina.

Per l'ottenimento di nanoassemblati stabili in soluzioni tamponate in condizioni di forza ionica fisiologiche il 30% dei siti di legame per la biotina è stato saturato con biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂

4.7.3. Purificazione dei nanoassemblati avidina-DNA

Nelle condizioni impiegate per la preparazione dei nanoassemblati avidina-DNA non tutta la avidina utilizzata risulta legata all'agente nucleante e l'eccesso rimane in soluzione in forma non assemblata. È stata quindi valutata l'efficienza di diverse metodiche di purificazione che permettessero di rimuovere avidina non assemblata senza alterare la struttura dei nanoassemblati. Sono state testate quattro diverse tecniche:

- cromatografia di esclusione dimensionale
- ultrafiltrazione in centrifuga
- ultrafiltrazione in micro cella
- filtrazione a flusso tangenziale

I prodotti purificati sono stati di volta in volta sottoposti ad analisi *mediante dynamic light scattering* e fluorescenza per valutare rispettivamente le dimensioni e la quantità di materiale recuperati.

4.7.3.a Purificazione mediante cromatografia di esclusione dimensionale

Per questi esperimenti è stata utilizzata una resina Sephacryl S-1000 Superfine (GE, Healthcare) caricata su una colonna di 2,6 cm di diametro e 70 cm di lunghezza. Come eluente è stato utilizzato tampone PBS mantenuto ad un flusso costante di 1,5 ml/min con una pompa peristaltica (Watson-Marlowe).

Sono stati preparati diversi campioni di nanoassemblati avidina-DNA genomico a rapporto di carica (+/-) variabile compreso tra 3 e 0,5. Il 30% dei siti per la biotina

(BBS) è stato saturato con biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂ per prevenire aggregazione in soluzione tamponata. Un ulteriore 2% dei BBS è stato saturato con biotina-Alexa⁵⁴⁶. Un volume pari a 1,5 ml ad una concentrazione di 0,43 mg/ml di ciascun campione è stato iniettato e, in uscita dalla colonna, sono state raccolte frazioni da 5 ml utilizzando un raccoglitore di frazioni Frac Collector 920 (GE Healthcare). Per ciascun campione di nanoparticelle è stata eseguita una eluizione di controllo iniettando la stessa quantità di avidina analogamente saturata con il polimero e il fluoroforo biotinilati. Dopo aver determinato come descritto al paragrafo 4.3.3.b la quantità di proteina presente in ciascuna frazione sono stati costruiti dei cromatogrammi sulla base della fluorescenza misurata normalizzata sul totale del segnale in uscita dalla colonna.

4.7.3.b Purificazione mediante ultrafiltrazione in centrifuga

La purificazione dei nanoassemblati avidina-DNA è stata effettuata utilizzando dei sistemi per ultrafiltrazione da centrifuga (Vivaspin, Sartorius Stedim) costituiti da una provetta in polipropilene e un filtro in cellulosa rigenerata avente cut-off pari a 100 KDa che permette di rimuovere la proteina non assemblata, che viene eliminata con il filtrato, trattenendo il complesso proteina-DNA. Sono state purificati dei nanoassemblati preparati a rapporto di carica +/- = 3.0 in cui il 30% dei BBS è stato saturato con biotina-(PEG₅₀₀₀)₂ e un ulteriore 2% dei BBS con il fluoroforo biotinilato ALEXA⁵⁴⁶. 0,5 ml di una soluzione di nanoassemblati 215 ug/ml in PBS posta in provetta dotata di filtro è stata concentrata mediante centrifugazione (8 minuti, 12500 g, 4°C) ad un volume di 0,1 ml. Cicli di diluizione, concentrazione sono stati ripetuti fino alla scomparsa di segnale fluorescente nel filtrato (4.3.3b). La soluzione trattenuta dal filtro, contenente i nanoassemblati purificati, è stata analizzata mediante spettroscopia di fluorescenza e *dynamic light scattering* (4.3.4.b) per determinarne e rispettivamente la quantità e la dimensione media.

4.7.3.c Purificazione mediante ultrafiltrazione in micro cella

La purificazione è stata effettuata in bagno di ghiaccio con un sistema per ultrafiltrazione a cella Amicon (Millipore) utilizzando una membrana in polieteresolfone (PES) con cut-off da 500Kda. Sono state purificate nanoparticelle avidina-DNA plasmidico, preparate a rapporto di carica +/- = 3.0, in cui il 25% e il 30% dei siti per la biotina sono stati saturati rispettivamente con biotina-Alexa⁵⁴⁶ e biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂. 350 ug di nanoassemblati sono diluiti ad un volume esatto di 10 ml con acqua milliQ quindi posti in cella. Cicli di ultrafiltrazione sono ripetuti concentrando il campione a 4 ml e ridiluendolo a 10 ml fino alla scomparsa di segnale fluorescente nella soluzione

filtrata (4.3.3.b). Il surnatante è prelevato e destinato ad analisi dimensionale mediante *dynamic light scattering* (4.3.4.b), analisi fluorimetrica (4.3.3.b) ed analisi funzionale mediante dot blot a rivelazione fluorescente (4.6.4.a).

4.7.3.d Purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale

Per la purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale si è utilizzato un sistema costituito da una pompa peristaltica (Watson-Marlowe) e una cartuccia per TFF Vivaflow 50 (Sartorius Stedim) con una membrana filtrante in cellulosa rigenerata (MWCO 100 KDa). La membrana è stata preventivamente lavata con facondo scorrere all'interno del circuito 1 litro di milliQH₂O, 0,5 litri di glicina 0.1 M e 0,5 litri di MilliQ H₂O. E' stata purificata una soluzione contenente 1 mg di nanoassemblati avidina-DNA preparati a rapporto di carica +/- = 3 in cui il 2% e il 30 % dei BBS sono stati saturati rispettivamente con biotina-Alexa⁵⁴⁶ e con biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂.

Tale soluzione è stata immessa nel circuito mantenuto ad un volume costante di 9 ml per continua aggiunta di acqua milliQ. La velocità di flusso in uscita dalla pompa di 30 ml/minuto ha permesso di sviluppare un flusso transmembrana di 15 ml/minuto. La soluzione filtrata è stata raccolta e analizzata mediante spettroscopia di fluorescenza (4.3.3.b) per quantificare la quantità di avidina presente nel filtrato. La soluzione trattenuta nel circuito, contenente i nanoassemblati purificati, è stata analizzata mediante spettroscopia di fluorescenza e *dynamic light scattering* (4.3.4.b) per determinare rispettivamente la quantità e la dimensione media del prodotto purificato.

4.7.4 Valutazione dell'efficacia analitica dei nanoassemblati

4.7.4.a Dot Blot a rivelazione fluorescente

Su una membrana di nitrocellulosa sono stati depositati spot di 0,5 ul di soluzioni a concentrazione compresa tra 200 e 0.5 ug/ml di biotin-PEG-IgG in PBS . La membrana, una volta asciutta, è stata immersa per 60 minuti a 37°C in BSA 2%, tween 20 0,01% in PBS. La rivelazione dell'analita biotinilato è stata effettuata incubando per ulteriori 120 minuti la membrana in una soluzione di nanoassemblati marcati con biotina-Alexa⁵⁴⁶, purificati mediante ultrafiltrazione in microcella, diluiti in in BSA 2%, tween 20 0,05% in PBS (PBST) una ad una concentrazione in avidina finale pari a 5 ug/ml. Come controllo una membrana identica è stata incubata con avidina non assemblata analogamente marcata con il fluoroforo biotinilato fluoroforo biotinilato. Le membrane sono quindi state lavate ripetutamente con PBS e, una volta asciutte, fotografate con un microscopio ottico in fluorescenza. Le immagini sono state acquisite

mantenendo costante il tempo di esposizione (2 secondi), l'ingrandimento (5X) e senza andare a saturare il rivelatore della fotocamera al fine di poter correlare la quantità di analita depositato con la quantità di segnale fluorescente sviluppato. L'analisi delle immagini effettuata con il software ImageJ (NIH) ha permesso, mediante l'integrazione del segnale luminoso prodotto, di costruire un grafico di tipo dose-risposta.

4.7.4.b Dot Blot a rivelazione enzimatica

Su una membrana di nitrocellulosa sono stati depositati *spot* di 0,2 μ l di soluzioni a concentrazione compresa tra 50 e 0,01 μ g/ml di biotin-PEG-IgG in PBS. La membrana, una volta asciutta, è stata immersa per 60 minuti a temperatura ambiente in una soluzione al 10% di latte scremato in PBS. La rivelazione dell'analita biotinilato è stata effettuata incubando 60 minuti la membrana in una soluzione di nanoassemblati diluiti ad una concentrazione di 4 μ g/ml in latte scremato al 10% in PBS. In questo esperimento sono stati utilizzati i nanoassemblati purificati mediante filtrazione a flusso tangenziale. Come controllo una membrana identica è stata analogamente incubata in una soluzione contenente avidina non assemblata. Le membrane sono quindi state lavate con PBS e immerse per 60 minuti in una soluzione contenente biotina-PEG-HRP 4 μ g/ml in latte scremato al 10% in PBS. Dopo una ulteriore fase di lavaggio con PBS le membrane sono state sviluppate per 10 minuti mediante immersione in una soluzione di diaminobenzidina 0,03 %, H_2O_2 0,05% in PBS. La presenza di perossidasi catalizza l'ossidazione del substrato che precipita producendo una colorazione marrone sulla membrana. Dopo numerosi lavaggi con acqua deionizzata e asciugatura è stata acquisita una immagine digitale delle membrane con uno scanner ottico. Utilizzando il software per analisi di immagini Image J è stata integrata la quantità di segnale prodotta e sono state ricavate delle curve di tipo dose – risposta in funzione della quantità di analita immobilizzato.

4.8. NANOASSEMBLATI AVIDINA-DNA STABILIZZATI

4.8.1. Preparazione dei nanoassemblati avidina-DNA stabilizzati

I nanoassemblati avidina-DNA, preparati come descritto al paragrafo 2.5.1, hanno subito un processo di stabilizzazione chimica. La struttura dello stabilizzante chimico utilizzato e i dettagli sperimentali relativi a questo processo sono attualmente riservati poiché sono oggetto di brevettazione.

4.8.2. Purificazione dei nanoassemblati avidina-DNA stabilizzati

I nanoassemblati stabilizzati sono stati purificati dall'eccesso di avidina non assemblata e da eventuali altri reattivi utilizzati durante la loro preparazione mediante sia mediante ultrafiltrazione in microcella che mediante filtrazione a flusso tangenziale.

4.8.2.a. Purificazione mediante ultrafiltrazione in microcella

La purificazione è stata effettuata in bagno di ghiaccio con un sistema per ultrafiltrazione a cella Amicon (Millipore) utilizzando una membrana in polietereosolfone (PES) con cut-off da 500Kda. 1,5 mg di nanoparticelle preparate a rapporto di carica +/- = 3.0, sono posti in cella e diluiti a un volume esatto di di 10 ml con tween20 0,05% in PBS. Dieci cicli di ultrafiltrazione sono ripetuti concentrando il campione a 4 ml e ridiluendolo a 10 ml. Ad ogni ciclo parte del surnatante è prelevata e destinata ad analisi dimensionale mediante dynamic light scattering ed analisi funzionale mediante saggi immunoenzimatici di tipo ELISA (2.7.4). Tutte le soluzioni eluate sono state analizzate con spettrofotometro UV (2.3.3.a) per quantificare la quantità di avidina rimossa.

4.8.2.b. Purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale

Per la purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale si è utilizzato un sistema costituito da una pompa peristaltica e una cartuccia per TFF Vivaflow 50 (Sartorius Stedim) con una membrana filtrante in cellulosa rigenerata (MWCO: 100Kda). La purificazione è effettuata a 4°C mantenendo il volume del circuito a volume costante (20 ml) mediante aggiunta di tampone PBS. La velocità di flusso in uscita dalla pompa di 30 ml/minuto ha permesso di sviluppare un flusso transmembrana di 15 ml/minuto. La soluzione filtrata è stata raccolta in aliquote e analizzata con spettrometro UV-VIS (4.3.3.a) per quantificare la quantità di avidina presente nel filtrato. La soluzione trattenuta nel circuito, contenente i nanoassemblati purificati, è stata analizzata mediante spettroscopia UV-VIS e *dynamic light scattering* (4.3.4.b) per determinare rispettivamente la quantità e la dimensione media del prodotto purificato.

4.8.3. Valutazione dell'efficacia analitica dei nanoassemblati stabilizzati in saggi immunoenzimatici (ELISA)

Micropiastre in polistirene a 96 pozzetti (EIA\RIA plate Easy Wash certified High Binding, Corning) sono state condizionate incubando per 12 ore a 4°C 100 μ l di una soluzione di anticorpo biotinilato (biotina-PEG-IgG) diluito in tampone carbonato 50mM pH9,6. La concentrazione di anticorpo durante il condizionamento della piastra è stata

variata tra i 550 ng/ml e 0.75 ng/ml. Le piastre sono quindi state lavate con PBS e incubate per 45 minuti a temperatura ambiente con 250 μ l di BSA 2%, tween 20 0,05% in PBS. La piastra è lavata 4 volte con PBST quindi incubata per due ore a 37°C sotto agitazione in 100 μ l di una soluzione di nanoassemblati stabilizzati diluiti in gelatina 0,1% / PBS ad una concentrazione finale di 4 μ g/ml. Come controllo alcuni pozzetti sono stati analogamente incubati con avidina non assemblata. La piastra è lavata 4 volte con PBST quindi incubata per 45' a 37°C sotto agitazione con 100 μ l di una soluzione di biotina-PEG-HRP 4 μ g/ml in gelatina 0,1% /PBS. Dopo ulteriori 4 lavaggi con PBST la piastra è sviluppata aggiungendo 100 μ l di soluzione contenente il substrato cromogenico ABTS (Sigma # A1888) 0,5 mg/ml, H₂O₂ 0,01% in citrato 0,1 M pH 5,5. Dopo 10 minuti è registrata l'assorbanza a 405 nm.

4.8.4. Studi di biodistribuzione in vivo

Per gli studi di biodistribuzione in vivo mediante imaging ottico di fluorescenza nel vicino infrarosso è stata scelta come sonda fluorescente il prodotto commerciale Alexa⁶⁸⁰ caratterizzato da l'unghezza d'onda di massimo assorbimento a 680 nm e massima emissione a 702 nm.

4.8.4.a. Sintesi della sonda fluorescente biotinilata

500 μ g di Alexa⁶⁸⁰-N-idrossisuccinimidilestere (peso molecolare: 1150; 430 nmoli) sono stati sciolti in 50 μ l di dimetilsolfossido (DMSO) anidro. Questa soluzione è aggiunta a 50 μ l di biotinammidoesilammina 2,68 mg/ml in DMSO anidro (peso molecolare: 342,2; 0,39 nmoli; 0,9 equivalenti) quindi sono aggiunti 5,44 μ l di trietilammina (TEA) diluita 1:100 in DMSO anidro (peso molecolare: 101.2; densità: 0,728 Kg/l; 0,39 nmoli; 0,9 equivalenti). La miscela di reazione è lasciata sotto agitazione per 2 ore al buio a temperatura ambiente quindi analizzata mediante *thin layer cromatography* (TLC) per verificare l'assenza di biotina non coniugata al fluoroforo. Sono state utilizzate lastre in alluminio per TLC ricoperte con gel di silice 60 F₂₅₄, usando come eluente una miscela CH₂Cl₂ / MeOH 1:1. I prodotti contenenti biotina sono stati individuati utilizzando il reattivo di Renz e Loew (Loew 1903) costituito da una soluzione idroalcolica di dimetilamminocinnamaldehyde acida per HCl, che reagisce con il biciclo della biotina dando una colorazione rosa. Tutta la biotina presente in reazione è risultata legata al fluoroforo. La soluzione contenente il prodotto finale biotina-Alexa⁶⁸⁰ 3,8 nmol/ml è stata quindi congelata in freezer a -18° C fino al suo utilizzo per la preparazione di nanoparticelle marcate.

4.8.4.b. Preparazione nanoassemblati marcati con biotina-Alexa⁶⁸⁰

Per la preparazione dei nanoassemblati marcati per gli studi di biodistribuzione in vivo si è partiti da una soluzione di nanoassemblati stabilizzati, preparati a un rapporto di carica +/- paria a 3, ad una concentrazione in avidina di 0,5 mg/ml. A 3 ml di questa soluzione è stata aggiunta una quantità di biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂ tale da saturare il 25% dei siti per la biotina totali (BBS). Dopo 45 minuti di incubazione a temperatura ambiente è stata aggiunta biotina-Alexa⁶⁸⁰ in maniera da saturare un ulteriore 50% dei BBS. Dopo altri 45 minuti di incubazione a temperatura ambiente al buio si è proceduto alla rimozione dell'avidina non assemblata e di eventuali altri reattivi non legati alle particelle mediante ultrafiltrazione in maniera analoga a quanto descritto al paragrafo 2.7.3.b. Cicli di concentrazione e ridiluzione sono stati ripetuti utilizzando come diluente PEG₈₀₀₀ 5 % in PBST fino a che nella soluzione filtrata non fosse più rilevabile la presenza del fluoroforo effettuata mediante misure di assorbimento UV-VIS. La soluzione trattenuta è stata centrifugata (14500 g, 3 minuti, 4°C) e il surnatante analizzato mediante *dynamic light scattering* per determinare la dimensione delle nanoparticelle marcate. Misure di assorbimento UV-VIS hanno permesso di risalire, data la ϵ molare a 680 nm pari a 180000 del fluoroforo, alla sua concentrazione. La soluzione di nanoassemblati marcati così ottenuta è stata utilizzata per gli studi di stabilità in plasma e per gli studi di biodistribuzione in vivo.

4.8.4.c. Verifica della marcatura dei nanoassemblati marcati con biotina-Alexa⁶⁸⁰

150 μ l di soluzione di nanoparticelle è caricata su colonna NAP-5 (Pharmacia) e viene eluita con PBS. Le frazioni raccolte in uscita dalla colonna sono state analizzate mediante misure di assorbimento UV a 280 nm e a 680 nm. Il profilo di eluizione ottenuto riportato in figura 9 mostra un andamento simile per l'assorbanza registrata alle due lunghezze d'onda, confermando l'avvenuto legame tra nanoparticella e fluoroforo che eluiscono contemporaneamente nel volume non trattenuto dalla colonna.

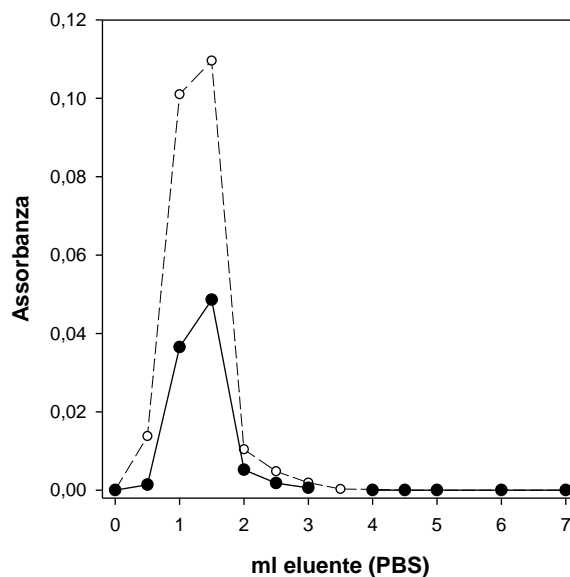


Figura 9. Profilo di eluizione ottenuto caricando nanoassemblati avidina-DNA marcati con biotina-Alexa680 su colonna per gel filtrazione NAP-5 (pharmacia). Le due curve si riferiscono all'assorbanza registrata a 280 nm e a 680 delle frazioni raccolte in uscita dalla colonna.

4.8.4.d. Stabilità in plasma di nanoassemblati marcati con biotina-Alexa⁶⁸⁰

E' stata verificata la stabilità del legame fluoroforo-nanoparticella in plasma bovino e in plasma murino. 100 μ l di soluzione di nanoassemblati marcati (concentrazione in fluoroforo = $1,5 \times 10^{-6}$ M) in PBST preparati come descritto poco sopra sono stati aggiunti a 400 μ l di plasma. La miscela è stata quindi dializzata (cut-off 12 KDa) in 10 ml di tampone PBST/Nipagina 0,1% sotto agitazione a 37°C. Sono stati effettuati dei prelievi di 2 ml a intervalli di tempo prestabiliti per una settimana ripristinando dopo ciascun prelievo il volume a 10 ml con tampone fresco. Come controllo lo stesso esperimento è stato ripetuto in parallelo con a) fluoroforo libero biotina-Alexa⁶⁸⁰ $1,5 \times 10^{-6}$ M in PBST e b) con solo tampone PBST. E' stata quindi misurata la fluorescenza di tutti i campioni prelevati. Le letture al fluorimetro sono state effettuate utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione pari a 680 nm (ampiezza banda di eccitazione = 5 nm) e una lunghezza d'onda di emissione di 790 nm (ampiezza banda di emissione = 10 nm). La percentuale di fluoroforo libera in funzione del tempo nei campioni di nanoassemblati marcati è stata ricavata sottraendo la fluorescenza dovuta al solo tampone (b) e normalizzando i valori così ottenuti rispetto a quelli relativi al solo fluoroforo libero (a).

4.7.4.e Primi studi di biodistribuzione mediante imaging ottico nel vicino infrarosso (NIR)

Questi primi studi di biodistribuzione sono stati effettuati presso i laboratori dell'Istituto Oncologico Veneto (I.O.V.) sotto la supervisione del Dottor Antonio Rosato. Gli esperimenti sono stati condotti su topi balb-c femmine nutriti con dieta a bassa fluorescenza per almeno due settimane prima degli esperimento. Il ventre degli animali è stato preventivamente depilato al fine di ridurre al minimo eventuali interferenze sulla misura. Un volume pari a 400 μ l delle soluzioni elencate in tabella 10 è stato iniettato a livello della vena caudale.

Tabella 10. Soluzioni utilizzate per studi di biodistribuzione in vivo su topo balb-c.

| Nome del campione | Concentrazione fluoroforo nmo/ml |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| biotina-Alexa ⁶⁸⁰ | 4,6 |
| avidina + biotina-Alexa ⁶⁸⁰ | 4,3 |
| avidina + biotina-Alexa ⁶⁸⁰ + biotina-(mPEG ₅₀₀₀) ₂ | 4,3 |
| nanoassemblati + biotina-Alexa ⁶⁸⁰ + biotina-(mPEG ₅₀₀₀) ₂ | 1,5 |

Prima dell'iniezione , subito dopo di essa e a intervalli di tempo prestabiliti (2, 6, 24 e 48 ore) gli animali sono stati anestetizzati ed è stata effettuata una scansione dell'intero corpo dell'animale utilizzando uno strumento eXplore Optix (GE Medical System, London-Ontario).

Le immagini in fluorescenza sono state acquisite utilizzando una sorgente luminosa a 670 nm, impostando il GATE (tempo di emivita della fluorescenza) pari a 1,2 μ secondi. L'area di interesse (ROI) impostata durante le scansioni include tutto l'animale esclusa la testa, la coda e le zampe.

A distanza di due settimane dalla prima iniezione agli animali trattati con nanoassemblati è stata somministrata una seconda dose di nanoassemblati e l'esperimento è stato ripetuto. Dopo due ulteriori settimane è stata somministrata una terza dose.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1. STUDIO DELL'INTERAZIONE AVIDINA-DNA

5.1.1. Messa a punto delle tecniche analitiche

La possibilità di ottenere informazioni dettagliate su un' interazione ad alta affinità fra due molecole dipende in larga misura dalla disponibilità di tecniche analitiche adeguate e sensibili per poter valutare la loro concentrazione anche nell'ordine di grandezza delle costanti attese.

Le informazioni preliminari, disponibili in laboratorio, suggerivano che la costante di dissociazione fosse nell'ordine nanomolare (M. Morpurgo, dati non pubblicati) e ciò perché tecniche diverse (*light scattering* ed EMSA in poliacrilammide con rivelazione all'argento nitrato) indicavano che essa esistesse nel *range* di concentrazione così basso.

Nel momento in cui si è iniziata l'indagine di questa tesi si è quindi reso necessario mettere a punto tecniche diverse per individuare la concentrazione di ciascuno dei componenti dell'interazione nel *range* nanomolare.

Nelle figure 10-12 vengono riportate le curve di calibrazione di metodiche analitiche ottimizzate in laboratorio per la quantificazione in soluzione di avidina totale, avidina libera, DNA plasmidico totale e DNA plasmidico libero. Le tecniche messe a punto consentono nel loro insieme di individuare i singoli componenti dell'equilibrio di legame $[A] [D]/[AD]$.

L'avidina libera in soluzione $[A]$ è stata determinata mediante RP-HPLC (figura 13). Questa tecnica consente di individuare avidina fino a 1 $\mu\text{g}/\text{corsa}$. Utilizzando un loop di caricamento di 500 μl , ciò consente di individuare la proteina libera in soluzione fino ad una concentrazione di 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, corrispondente a circa 30 nM.

L'avidina totale (libera e legata all'acido nucleico $[AD]+[A]$) è stata invece quantificata in soluzione per via fluorescente. A questo scopo una piccola porzione dei suoi siti di legame per biotina sono stati saturati con il fluoroforo biotina-alexa. La concentrazione della proteina è stata quindi ricavata dal segnale del fluoroforo ad essa legato. La figura 14 riporta una curva di calibrazione ottenuta per questo tipo di complesso, nella

quale la linearità viene mantenuta fino a meno di 1 µg/ml, corrispondente a circa 15 nM.

La concentrazione di DNA plasmidico e la discriminazione tra lo stato di libero o legato in un complesso è stata ottenuta mediante gel di agarosio con rivelazione fluorescente. Grazie al trans-illuminatore Gel Doc della Bio Rad e del programma di analisi dell'immagine *Image J*, questa tecnica consente una linearità di risposta almeno fra 15 a 75 ng/pozzetto, che corrispondono a concentrazioni in soluzione pari a 0,75 e 3,25 µg/ml, che a loro volta corrispondono a concentrazioni di plasmide tra 0,2 e 1 nM.

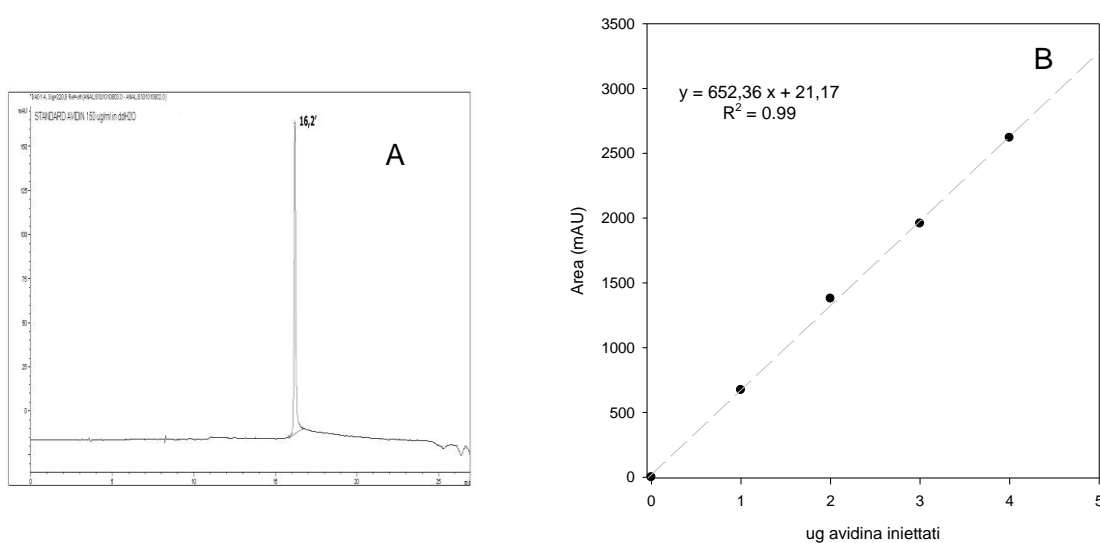


Figura 10. Determinazione di avidina libera in soluzione mediante cromatografia HPLC-RP (colonna Jupiter C18; flusso 1ml/min; loop 500 µl). In A un esempio di corsa cromatografica; in B la retta di calibrazione ottenuta iniettando in colonna quantitativi di avidina variabili tra 1 e 4 µg. Tali quantitativi corrispondono a soluzioni di avidina nella soluzione iniettata tra 2 e 8 µg/ml. Il picco dell'avidina esce a 16,2 minuti.

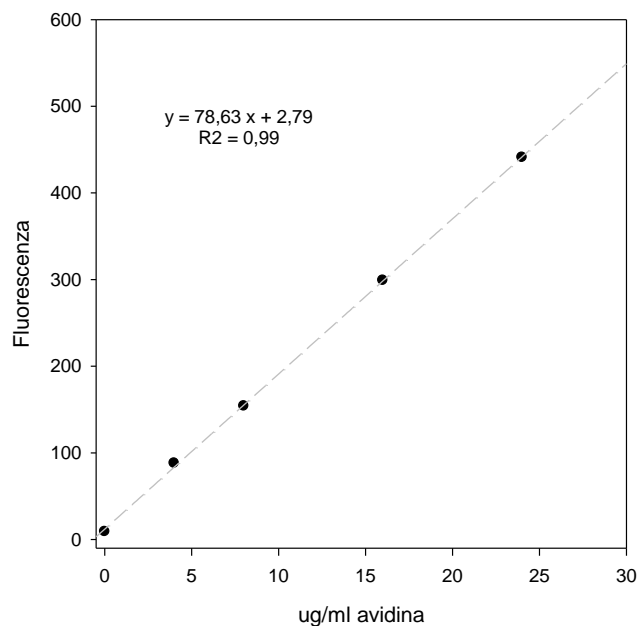


Figura 11. Curva di taratura per la determinazione di avidina per via fluorimetrica. Il 4% dei siti di legame per biotina sono stati saturati con biotina-Alexa-546. E' inoltre riportata l'equazione di tale retta.

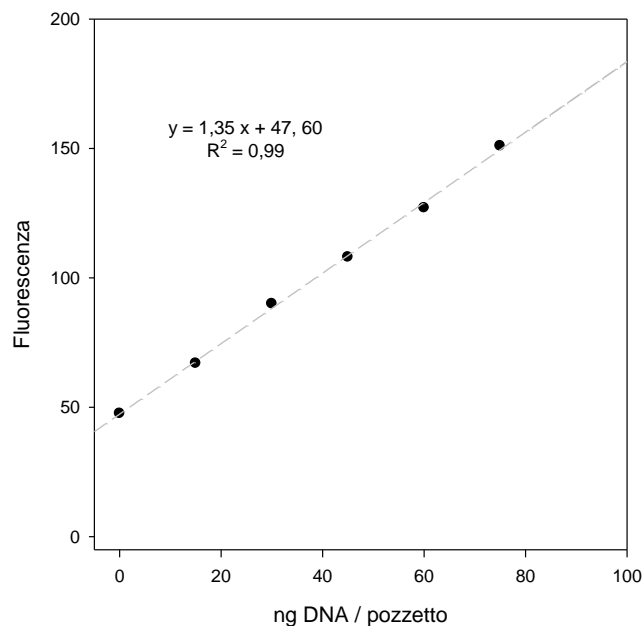


Figura 12. Retta di taratura del DNA plasmidico a concentrazioni note, mediante elettroforesi in gel di agarosio 0,8 %, contenente etidio bromuro allo 0,05 % e immerso in tampone TBE (pH 8.0). Il gel è stato fatto correre per 90 minuti ad una tensione di 70 mV. In ciascun pozzetto sono stati caricati 20 μ l di soluzione di DNA in un range di concentrazioni variabile tra 0,75 e 3,75 μ g/ml.

5.1.2. Studi di interazione con DNA plasmidico

5.1.2.a. Stechiometria dell'interazione in acqua e tampone

In questo esperimento sono state preparate diverse miscele di avidina e plasmide tenendo costante la concentrazione della proteina e variando quella dell'acido nucleico. Si è quindi andati a misurare via HPLC la quantità di avidina libera in soluzione, la quale cala all'aumentare della quantità di acido nucleico. L'esperimento è stato condotto miscelando i due componenti sia in acqua che in tampone fosfato, al fine di evidenziare l'eventuale diversità di interazione nei due ambienti. L'ambiente privo di sali favorisce infatti interazioni non specifiche basate sull'attrazione di carica. L'ambiente salino del PBS invece sfavorisce questo tipo di interazione consentendo solo quelle che necessitano di specificità.

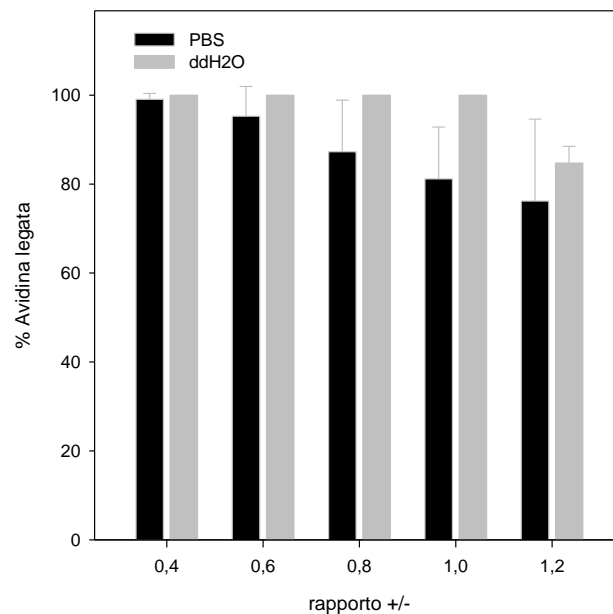


Figura 13. Nel grafico sono rappresentate la % di avidina legata al DNA plasmidico in funzione del rapporto di carica tra i due componenti. In grigio sono riportati i dati ottenuti miscelando i due componenti in acqua deionizzata. In nero sono riportati i risultati ottenuti miscelando i due componenti in tampone PBS. L'esperimento è stato condotto preparando diverse miscele di avidina e plasmide, mantenendo costante la quantità di avidina (332,5 µg/ml; 5 µM) e variando la quantità di DNA da 77 a 230 µg/ml.

In figura 13 viene riportata la % di avidina sequestrata dall'acido nucleico in funzione del rapporto di carica presente nella miscela. La porzione di avidina che rimane legata stabilmente al DNA è maggiore quando l'interazione viene fatta avvenire in acqua. In queste condizioni tutta la proteina rimane sequestrata dall'acido nucleico fino a quando

non viene raggiunta la neutralità elettrostatica. Nel caso invece dell'esperimento condotto in tampone PBS, il sequestro quantitativo della proteina avviene solo fino ad un rapporto di carica pari a 0,4 dopo di che, la % di avidina libera inizia a salire.

I dati consentono di calcolare in via approssimativa il numero di molecole di avidina che si legano a ciascun plasmide, fornendo quindi indicazioni sulla potenziale dimensione del sito di legame a livello dell'acido nucleico nelle due condizioni testate. I valori calcolati sono riportati nella tabella 11.

Tabella 11. Calcolo approssimativo del numero di molecole di avidina che si legano al DNA e della dimensione del sito di legame, nei diversi rapporti di carica e in ambienti differenti (acqua e tampone).

| +/- | H ₂ O | | PBS | |
|-----|----------------------|------------|----------------------|------------|
| | Avidine/ plasmide | Bp/avidina | Avidine/ plasmide | Bp/avidina |
| 0,4 | 139,5±0 | 33,6 | 138±2 | 34,0 |
| 0,6 | 209±0 | 22,5 | 199±14 | 23,6 |
| 0,8 | 279±0 | 16,8 | 244±32 | 19,3 |
| 1 | 349±0 | 13,5 | 2831±41 | 16,6 |
| 1,1 | 366±0 | 12,8 | nd | nd |
| 1,2 | 355±15 | 13,25 | 319±77 | 14,7 |

Emerge che in acqua il sistema si equilibra ad un rapporto tra avidina e plasmide tale per cui sono a disposizione per ciascuna molecola proteica circa 13 paia di basi. In tampone invece il sistema non sembra arrivare ad un equilibrio (almeno nelle condizioni testate) e la dimensione del sito di legame diminuisce sempre più all'aumentare del rapporto di carica. Al crescere di quest'ultimo sempre più avidine si uniscono al DNA, forse fino a convergere al valore ottenuto in acqua che, nel caso in cui il DNA mantenesse la sua struttura B (0,34 nm/base), corrisponderebbe ad una distanza tra le varie unità proteiche di circa 5 nm.

Dato che in tampone una porzione del complesso precipita, non è possibile da questo esperimento dedurre alcuna informazione a riguardo della forza di interazione e le relative costanti.

5.1.2.b. Determinazione della K_d in tampone

Il fatto che una porzione del complesso precipiti dalla soluzione rende infatti difficoltosa la determinazione della costante di equilibrio, perché rende impossibile basarsi sulle

quantità dei componenti introdotte nella miscela (e quindi esattamente note) per ricavare la concentrazione dei diversi elementi dell'equilibrio. La situazione è resa ancora più complicata dal fatto che la dimensione del sito di legame sul DNA (*Dna Binding Site*-DBS) non è nota con precisione, per cui non è possibile a priori immettere nell'equazione di equilibrio la sua concentrazione a partire da quella del plasmide.

Informazioni a riguardo della forza di interazione sono quindi state dedotte nell'esperimento complesso descritto di seguito.

L'avidina ed il plasmide sono stati mescolati in tampone in due rapporti di concentrazione diversi (+/- = 0,6 e 0,8). Dopo aver eliminato dalla soluzione la porzione insolubile mediante centrifugazione a 15000 rpm (16000 g), sono state determinate le concentrazioni dei singoli componenti dell'equilibrio. In particolare:

- a) la concentrazione di avidina libera è stata determinata per HPLC;
- b) la concentrazione di avidina totale (libera e legata al DNA) è stata misurata per fluorescenza;
- c) dalla differenza dei valori di a) e b) è stata ricavata la concentrazione di avidina legata, la quale è uguale a quella dei DBS occupati;
- d) la concentrazione di DNA totale in soluzione è stata ricavata mediante analisi di immagine del gel di agarosio della soluzione (rivelazione con bromuro di etidio) e da questa, sono state effettuate diverse previsioni relative alla concentrazione dei DBS liberi, ipotizzando che la loro dimensione potesse essere tra 14 e 23 paia di basi.

I valori di concentrazione calcolati per ciascuna delle due soluzioni testate sono stati imposti nell'equazione di equilibrio. Per ciascuno dei due equilibri (+/- = 0,6 e 0,8) sono stati così ricavati più valori di K_d , uno per ciascuna dimensione del DBS ipotizzata.

Per ciascuna dimensione del DBS ipotizzata sono quindi stati confrontati i valori di K_d ricavati da ciascuna delle due soluzioni, ne è stato calcolato il valore medio e la deviazione standard %. La tabella 12 riporta i valori ottenuti, i quali a loro volta sono stati posti in grafico nella figura 17.

A seconda della dimensione del sito di legame ipotizzata, risulta che la costante di dissociazione varia tra $1,31 \times 10^{-7}$ M a $3,98 \times 10^{-9}$ M. Informazioni ulteriori si possono invece ottenere dall'osservazione dell'andamento della deviazione standard percentuale: essa cala sistematicamente al crescere delle dimensioni del DBS ipotizzate, fino a raggiungere un minimo (stdv % = 9,3) al valore di DBS pari a 22,5 paia di basi. Ciò suggerisce che la dimensione del DBS più probabile sia di 22,5 paia di basi, con una costante di dissociazione nanomolare.

Tabella 12. I valori di K_d determinati nelle due condizioni sperimentali testate e ricavati ipotizzando una dimensione del DBS variabile tra 14 e 23 paia di basi.

| dimensione del sito di binding (bp) | K_d (M) (+/- 0,6) | K_d (M) (+/- 0,8) | K_d media (M) | K_d St dev | K_d St dev % |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|-----------------|--------------|----------------|
| 14 | 0,87E-07 | 2,67E-07 | 1,31E-07 | 1,27E-07 | 96,8 |
| 15 | 0,72E-07 | 2,20E-07 | 1,09E-07 | 1,04E-07 | 95,9 |
| 16 | 0,59E-07 | 1,80E-07 | 8,95E-08 | 8,48E-08 | 94,7 |
| 17 | 0,48E-07 | 1,44E-07 | 7,24E-08 | 6,75E-08 | 93,2 |
| 18 | 0,38E-07 | 1,12E-07 | 5,71E-08 | 5,20E-08 | 91,1 |
| 19 | 2,94E-08 | 8,35E-08 | 4,34E-08 | 3,83E-08 | 88,1 |
| 20 | 2,13E-08 | 5,78E-08 | 3,11E-08 | 2,58E-08 | 83,0 |
| 21 | 1,40E-08 | 3,46E-08 | 1,99E-08 | 1,46E-08 | 73,3 |
| 22 | 0,73E-09 | 1,36E-08 | 9,54E-09 | 4,40E-09 | 46,1 |
| 22,5 | 4,26E-09 | 3,74E-09 | 3,98E-09 | 3,68E-10 | 9,3 |
| 23 | 1,29E-09 | -5,6E-09 (*) | 3,35E-09 | 4,93E-09 | 147,0 |

(*) non possibile

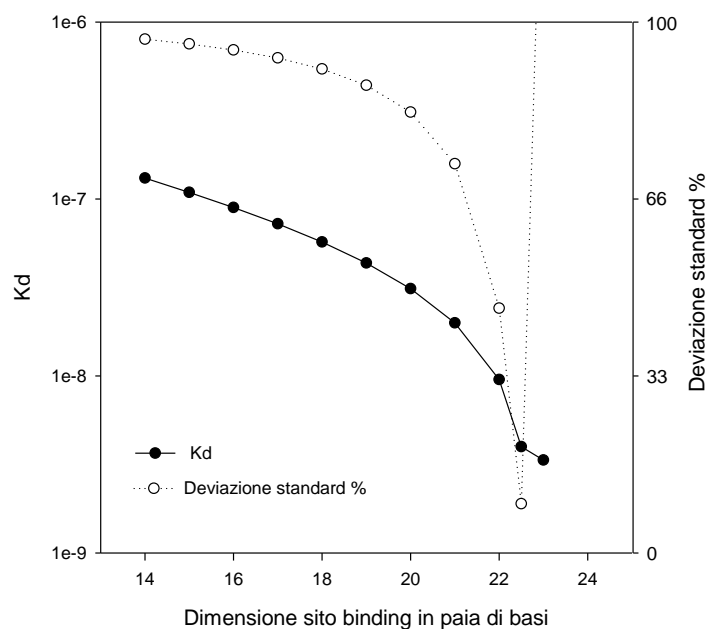


Figura 14. In questo grafico è rappresentata la variazione della costante di dissociazione K_d tra avidina e DNA plasmidico all'aumentare della dimensione del sito di legame, espresso in paia di basi (\bullet). E' riportata inoltre la variazione della deviazione standard % (\circ), sempre in rapporto alla dimensione del sito di legame. Questo grafico è stato ottenuto incrociando i dati provenienti da tre metodiche differenti, HPLC-RP, fluorimetro e gel di agarosio.

E' comunque interessante notare che la dimensione del DBS ricavata da questo esperimento è maggiore rispetto a quella osservata nell'esperimento precedente, nel quale appariva che in acqua il plasmide fosse in grado di accomodare una molecola di avidina ogni 13 paia di basi circa, valore al quale sembrava tendere anche l'esperimento in PBS. E' però da tenere presente che i due esperimenti sono stati condotti in *range* di concentrazione diversi, il primo 25 volte più concentrato del secondo. E' quindi possibile che benché il DNA abbia la capacità fisica di accomodare una molecola di avidina ogni 13 paia di basi circa, il sito richiesto per l'interazione ad alta affinità sia di fatto più ampio, cioè di 22.5 paia di basi indicate dal secondo esperimento. A concentrazioni maggiori probabilmente interviene una seconda interazione, questa volta di minore affinità, che una volta ricoperti tutti i siti ad alta affinità, inizierebbe a saturare il resto dello spazio disponibile.

5.1.3. Studi di interazione con oligomeri di DNA

Gli esperimenti descritti nei paragrafi precedenti, essendo stati condotti utilizzando DNA plasmidico a sequenza "casuale", hanno fornito una costante di dissociazione media, indipendente cioè dalla sequenza nucleotidica. Nel tentativo di individuare una eventuale specificità, sono stati quindi intrapresi esperimenti di fluorescenza al triptofano. L'avidina possiede infatti 4 residui di triptofano per ciascuna subunità e gli studi condotti da Struthers e Connors (Struthers, 1998 e Connors, 2005) avevano evidenziato che l'aggiunta ad una soluzione di avidina di nucleotidi naturali o dei loro prodotti ossidati così come di oligonucleotidi sintetici modificava il suo spettro di fluorescenza.

Sono stati quindi intrapresi una serie di esperimenti di misura del *quench* della fluorescenza del triptofano, impiegando semplici sequenze omo-oligomeriche a singola catena, a 8 o 16 paia di basi (tabella 13). Lo stesso esperimento è anche stato condotto con gli esadecameri C16 e G16, una volta appaiati in doppio filamento. Questa coppia di oligonucleotidi era l'unica fra quelle selezionate che possedeva un *t-melt* sufficientemente elevato da potere esistere stabilmente in forma appaiata alle condizioni del saggio (25°C, TRIS, 50mM, pH 7.4).

Tabella 13. Perdita di segnale di fluorescenza del triptofano di avidina in seguito all' interazione con i diversi oligonucleotidi. Il valore è espresso come % di perdita sulla fluorescenza iniziale. I valori sono stati ottenuti direttamente dal dato sperimentale o sono stati calcolati dall'interpolazione matematica delle curve di binding effettuata con il programma Sigma Plot. I valori sono il risultato di più esperimenti nei quali la concentrazione di avidina era di 5, 10 o 25 µg/ml.

| oligonucleotide | # di basi ss o ds | perdita di segnale % |
|-----------------|-------------------|----------------------|
| C | 8 | 64,4±8,8 |
| C | 16 | 46,5±8,9 |
| A | 8 | 59,0±7,5 |
| A | 16 | 45,3 |
| T | 8 | 72,2±2,5 |
| T | 16 | 64,8 |
| G | 8 | 81,9 |
| G | 16 | 56,7±8,3 |
| C · G | 16 | 25,9±2,9 |

Il primo dato interessante emerge dall'analisi dei minimi di fluorescenza registrati con i diversi oligomeri: benché la fluorescenza venga ridotta da ognuno di essi, il minimo raggiunto è diverso a seconda della sequenza in esame. Nella tabella 8 e in figura 18 vengono riportate le perdite di fluorescenza percentuale registrate con ciascuna sequenza. La perdita di fluorescenza è secondaria alla natura chimica della base azotata e a parità di chimica, alla vicinanza della base con i triptofani proteici. Il fatto che ciascuna sequenza oligomerica a singola catena dia un diverso grado di *quench* può quindi essere dovuto alla diversa chimica delle sue basi, e/o ad un loro diverso orientamento rispetto ai triptofani o una diversa distanza.

Emerge inoltre che, a parità di sequenza, gli esadecameri riducono la fluorescenza in modo meno efficiente degli ottameri. In media, la perdita di fluorescenza percentuale indotta dagli esadecameri è circa 70-80% di quella degli ottameri corrispondenti. In questo caso non è possibile ascrivere la differenza alla chimica delle basi; una spiegazione possibile potrebbe essere che la diversa lunghezza dell'oligomero fa sì che le medesime basi si orientino in modo diverso rispetto ai triptofani.

Ancora più interessante è il fatto che il *quench* indotto dalla miscela C16·G16 in forma appaiata è il minore tra quelli registrati e decisamente inferiore a quello indotto dalle singole sequenze in forma di singolo filamento. Una spiegazione possibile è che nel

caso del singolo filamento, le basi azotate interagiscono direttamente con la superficie della proteina, dove sono presenti i triptofani. Una volta coinvolte nell'accoppiamento con la sequenza complementare, le medesime basi non sono più disponibili per lo stesso tipo di interazione. Verosimilmente il modo di legarsi delle sequenze a singolo filamento non è lo stesso di quello del doppio filamento.

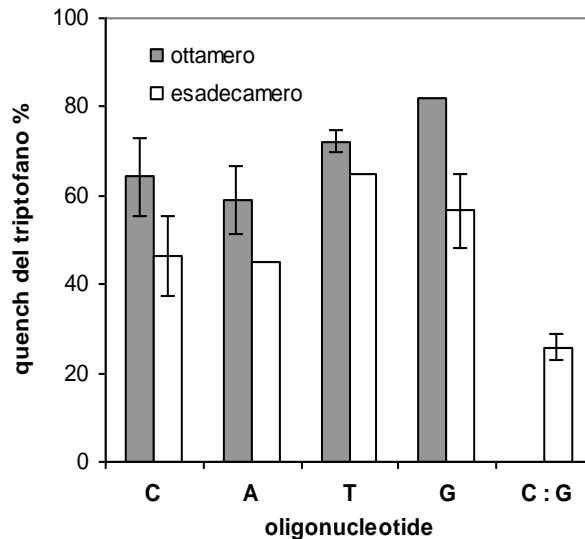


Figura 15. Perdita media del segnale di fluorescenza del triptofano di avidina secondaria all'interazione con i diversi oligonucleotidi. Il valore è espresso come % di perdita sulla fluorescenza iniziale. I valori sono stati ottenuti direttamente dal dato sperimentale o sono stati calcolati dall'interpolazione matematica delle curve di legame effettuata con il programma Sigma Plot. I valori medi sono il risultato di più esperimenti, nei quali la concentrazione di avidina era di 5, 10 o 25 $\mu\text{g/ml}$.

Le curve di legame registrate con i diversi oligonucleotidi sono riportate nelle figure 16-20. Più precisamente, nelle figure 16 e 17 vengono confrontate fra loro le curve di *binding* registrate rispettivamente con gli ottameri e gli esadecameri. Nella parte sinistra delle figure (A), il dato è riportato come variazione del valore di $F_{\text{max}}-F$ in funzione della concentrazione di oligonucleotide. Il valore massimo di $F_{\text{max}}-F$ ottenuto sperimentalmente o, se non raggiunto sperimentalmente, calcolato attraverso il migliore *fit* matematico del dato sperimentale (programma Sigma-plot), è stato poi utilizzato per normalizzare i dati esprimendo le curve come nei riquadri di destra (B) in percentuale di legame. Da queste ultime curve la sequenza che appare legarsi con maggiore efficienza, indipendentemente dalla lunghezza, è la poly G, seguita da poly C e poi ancora da poly A e poly T che sembrano avere una simile affinità.

Nei quattro pannelli di figura 18, le percentuali di legame per ciascun tipo di base sono state poste in grafico in funzione della concentrazione di nucleotide. Questo grafico consente di visualizzare in modo diretto se l'allungamento della sequenza porta ad un

aumento di affinità. Si osserva che tutti gli esadecameri si legano all'avidina in modo più efficiente rispetto ai loro rispettivi ottameri. Più precisamente, le curve sembrano coincidere nella prima parte per poi divergere nella seconda dove nel caso degli ottameri assumo un andamento più lento.

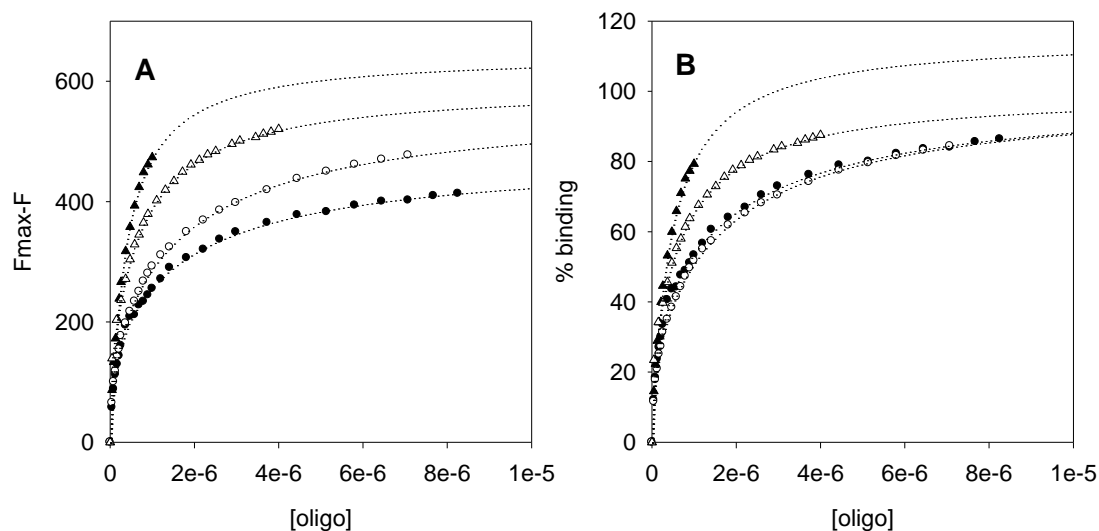


Figura 16. Curve di legame tra avidina e gli omo-oligomeri A8 (\bullet), T8 (o), G8 (\blacktriangle) e C8 (\triangle), ottenute mediante analisi di fluorescenza del triptofano. Gli esperimenti qui riportati sono stati effettuati con avidina a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In A vengono riportati i dati espressi come delta di fluorescenza rispetto al valore massimo misurato prima della titolazione. In B, gli stessi dati sono stati normalizzati in percentuale di legame (vedi metodi).

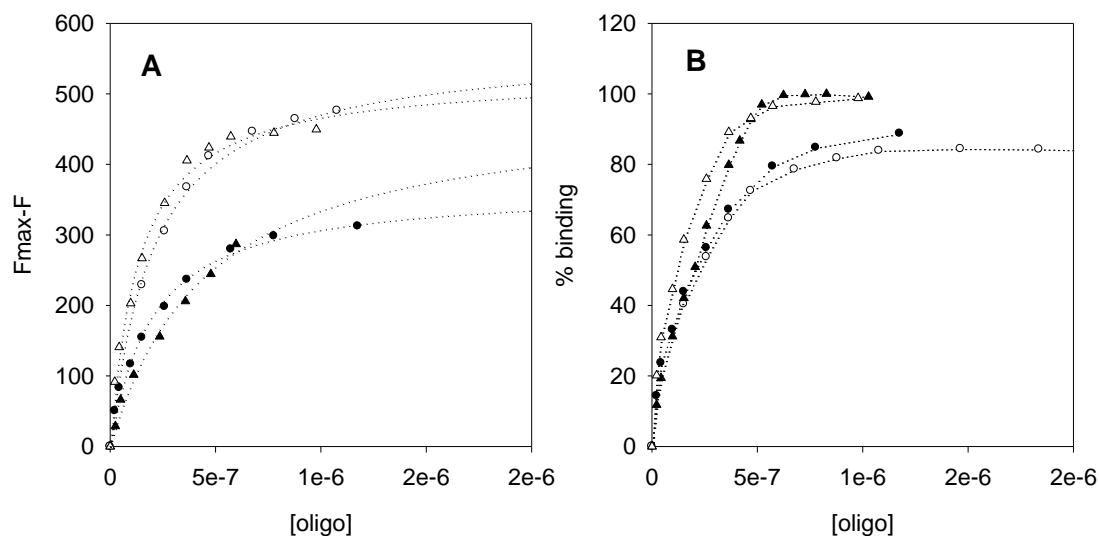


Figura 17. Curve di legame tra avidina e gli omo-oligomeri A16 (\bullet), T16 (o), G16 (\blacktriangle) e C16 (\triangle), ottenute mediante analisi di fluorescenza del triptofano. Gli esperimenti qui riportati sono stati effettuati con avidina a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In A vengono riportati i dati espressi come delta di fluorescenza rispetto al valore massimo misurato prima della titolazione. In B, gli stessi dati sono stati normalizzati in percentuale di legame (vedi metodi).

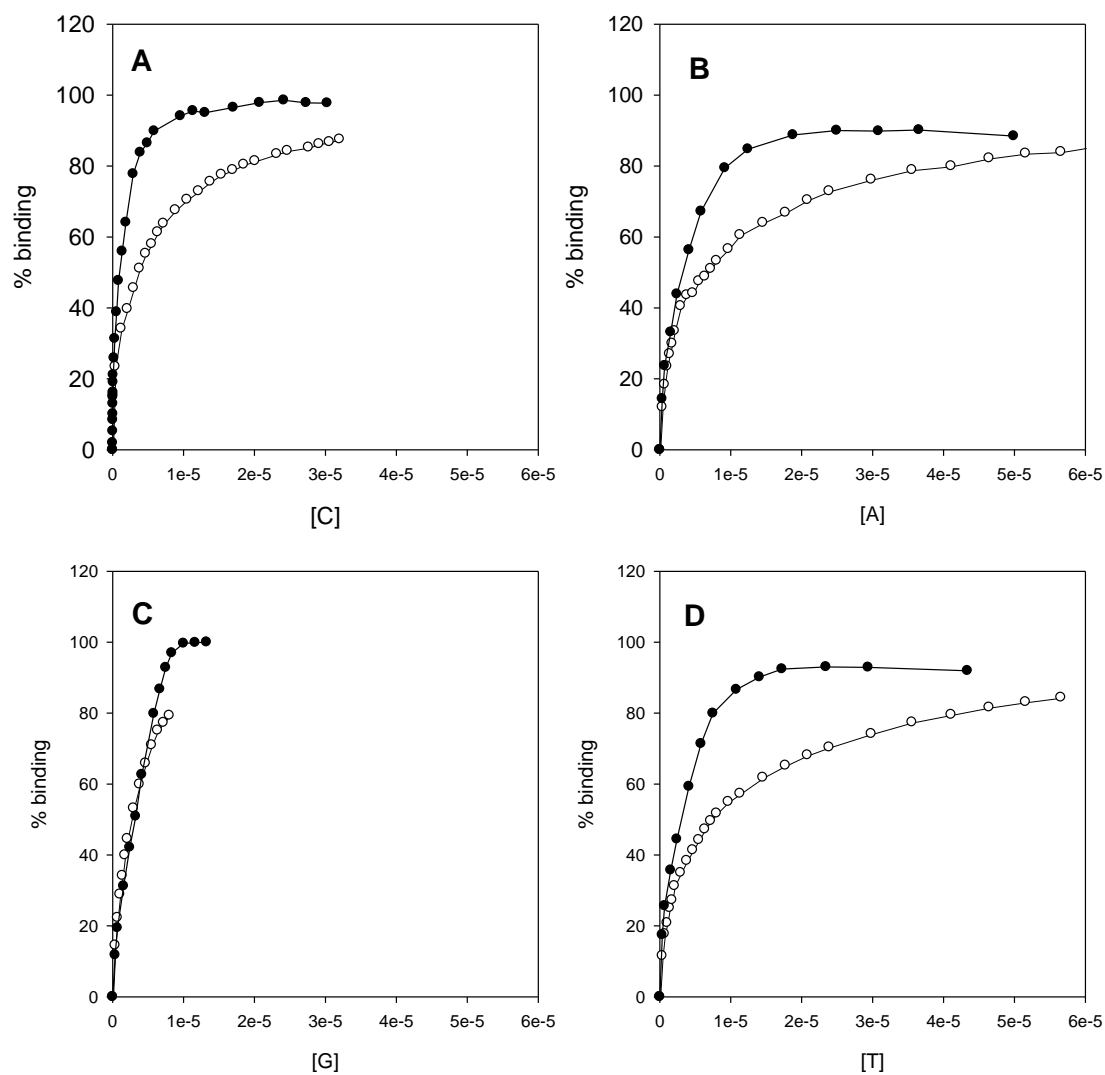


Figura 18. Confronto tra le curve di legame tra avidina e gli omo-ottameri (o) e omo-esadecameri (●). A: C8 vs C16; B: A8 vs A16; C: G8 vs G16; D: T8 vs T16. La percentuale di legame è stata posta in grafico in funzione della concentrazione di nucleotide. Gli esperimenti qui riportati sono stati effettuati con avidina a 25 $\mu\text{g/ml}$.

Infine, in figura 19, sono state messe a confronto le curve di legame con gli esadecameri a singola catena C16 e G16 con quella degli stessi una volta appaiati in forma di DNA a doppio filamento. Gli stessi valori di percentuale di legame sono stati posti in grafico in funzione della concentrazione di oligomero (A) e di nucleotide (B). Emerge in modo chiaro come il legame con l'oligomero a doppia catena avvenga in modo molto più efficiente rispetto ai singoli oligomeri a singola catena.

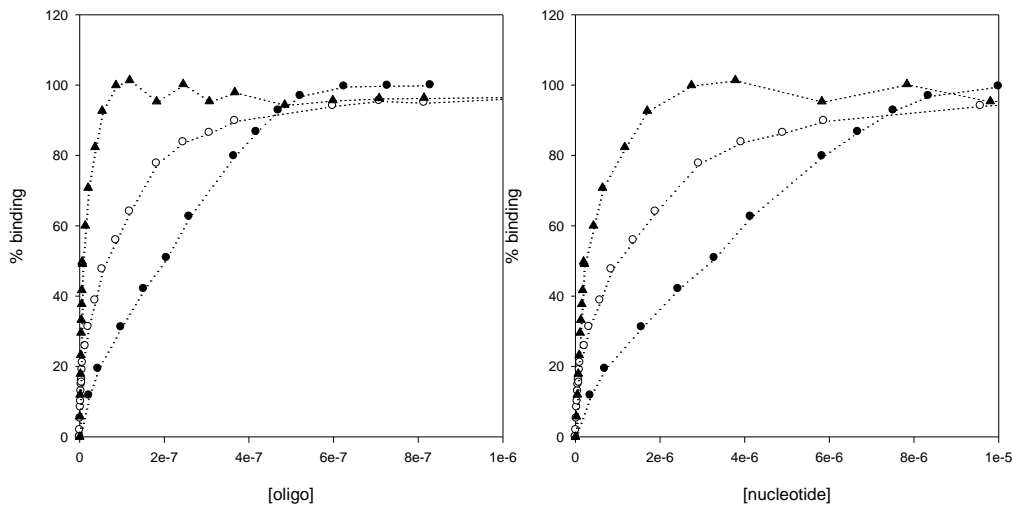


Figura 19. Confronto tra le curve di legame tra avidina e gli omo-esadecameri a singola catena C16 (o) e G16 (●) e a appaiati G16-C16 (▲). In A, la percentuale di legame è stata graficata in funzione della concentrazione di oligomero; in B, gli stessi dati sono stati graficati in funzione della concentrazione di nucleotide. Gli esperimenti qui riportati sono stati effettuati con avidina a 25 $\mu\text{g/ml}$.

Tutte le curve sono inoltre state elaborate con il programma sigma plot e *fitte* con le equazioni che descrivono equilibri di legame con uno o due siti di legame/proteina. Le costanti ricavate dai migliori *fit* sono riportate numericamente nella tabella 9 e gli stessi dati sono posti in grafico nella figura 20.

Tabella 14. Costanti di dissociazione ottenute con il metodo della fluorescenza.

| oligonucleotide | # di basi ss o ds | Kd ₁ (M) | Kd ₂ (M) |
|-----------------|-------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| A | 8 | $1,23 \pm 0,16 \times 10^{-7}$ | $2,29 \pm 0,31 \times 10^{-6}$ |
| A | 16 | $1,68 \pm 0,13 \times 10^{-7}$ | Singolo legame |
| T | 8 | $2,18 \pm 1,6 \times 10^{-7}$ | $2,87 \pm 1,1 \times 10^{-6}$ |
| T | 16 | $1,22 \pm 0,19 \times 10^{-7}$ | Singolo legame |
| G | 8 | $3,082 \pm 0,2 \times 10^{-7}$ | $3,082 \pm 0,2 \times 10^{-7}$ |
| G | 16 | $1,65 \pm 0,22 \times 10^{-7}$ | Singolo legame |
| C | 8 | $1,4 \pm 1,29 \times 10^{-7}$ | $6,37 \pm 1,32 \times 10^{-7}$ |
| C | 16 | $4,82 \pm 0,09 \times 10^{-8}$ | Singolo legame |
| C · G | 16 | $7,67 \pm 0,42 \times 10^{-9}$ | Singolo legame |

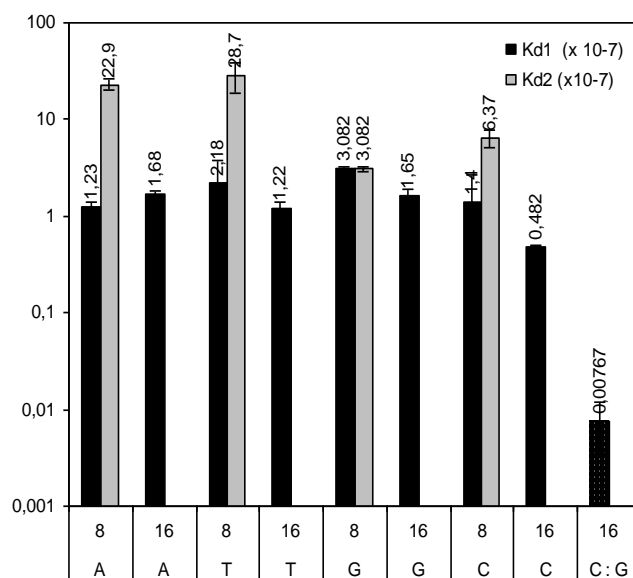


Figura 20. Le costanti di dissociazione (10^{-7} M) calcolate dal programma Sigma Plot. Nel caso degli omo-ottameri, il programma ha indicato due costanti distinte, mentre nel caso degli esadecameri (a singolo o doppio filamento) il programma ha calcolato una costante di legame unica. La prima costante è mostrata con la barra nera. Quando presente una seconda costante, questa è rappresentata con la barra grigia.

Emerge interessante il fatto che mentre gli esadecameri presentano una singola costante di affinità, gli ottameri hanno un andamento sdoppiato e cioè due costanti di dissociazione, la seconda a minore affinità della prima.

Nel caso degli esadecameri a singolo filamento A16, T16 e G16, la K_d è di circa $1,5 \times 10^{-7}$ M, mentre il C16 mostra una affinità maggiore di circa 3 volte (5×10^{-8} M). Nel caso degli omo-ottameri, la prima interazione avviene con K_d dello stesso ordine di grandezza di quelle degli esadecameri (tra $1,2$ e 3×10^{-7} M), mentre il secondo legame avviene con affinità inferiore (variabile tra 3 e 28×10^{-7} M) e con differenze significative tra le sequenze, dove l'affinità più alta si registra con il G8.

Questi risultati spiegano l'andamento osservato nelle curve di legame dove nel confronto fra ottameri e esadecameri (figura 18) emergeva un andamento inizialmente simile (dettato dalla prima costante, K_{d1}) che poi divergeva nella seconda parte della curva, governata dalla medesima costante nel caso degli esadecameri e dalla K_{d2} nel caso degli ottameri.

Nel caso dell'oligomero a doppio filamento la costante di affinità è di due ordini di grandezza superiore a quanto osservato nel caso dei singoli filamenti. Da osservare che l'ordine di grandezza è lo stesso di quello registrato nell'esperimento con il DNA plasmidico. Ciò riconferma l'ipotesi già avanzata in precedenza che suggeriva una modalità di interazione con la proteina molto diversa tra il DNA a singola o doppia catena.

C'è da notare che tutti i risultati descritti finora fanno riferimento ad esperimenti condotti in assenza di biotina. In presenza di biotina le indagini di fluorescenza (non mostrate) non hanno fornito alcuna informazione perché la biotina stessa riduce il segnale coordinando in modo stabile 3 dei quattro triptofani proteici. Ciò fa sì che, in sua presenza, la fluorescenza dei triptofani non risulti più sensibile alla presenza degli oligonucleotidi. Pur tuttavia, i dati di letteratura indicano che in presenza di biotina la forza di interazione tra avidina e DNA aumenta, almeno per quanto osservato con il DNA plasmidico (Morpurgo, Radu et al. 2004). È quindi possibile che l'interazione tra avidina-biotina e gli oligonucleotidi avvenga, ma non sia rilevabile con la tecnica della fluorescenza del triptofano.

Risulta quindi necessario individuare una tecnica di indagine alternativa. Una possibile potrebbe essere quella della microcalorimetria, che si avvale della misura del calore che si libera in seguito all'interazione tra due ligandi. La misura con il microcalorimetro è però possibile solo se l'interazione tra i due ligandi risulta essere l'unico fenomeno che avviene in soluzione. In particolare, non devono avvenire altri fenomeni, pur secondari all'interazione, che a loro volta liberano od assorbono calore, quali ad esempio aggregazioni o precipitazioni.

In fase preliminare, quindi, sono stati intrapresi studi per verificare se secondariamente all'interazione di avidina con gli oligomeri non avvenissero fenomeni di aggregazione/precipitazione. Le varie soluzioni sottoposte all'analisi di fluorescenza sono quindi state analizzate mediante spettrofotometria di assorbimento UV-Vis e mediante *Dynamic Light Scattering*. Entrambe le tecniche permettono di individuare l'eventuale formazione di assemblati/aggregati di dimensioni colloidali variabili tra qualche unità (DLS solo) e qualche centinaio (DLS e UV-Vis) di nanometri.

Nelle figure 21 e 22 vengono riportati come esempio i risultati di analisi DLS e UV-Vis effettuate su di una delle numerose miscele testate. Entrambe le tecniche mostrano chiaramente la presenza di aggregati. La maggior parte delle miscele testate hanno rivelato la formazione di aggregati (tabella 15). Essi si formano lentamente e non interferiscono con la misura della fluorescenza, ma pregiudica di fatto la possibilità di utilizzare la microcalorimetria come tecnica di indagine.

Un dato interessante è che la formazione degli aggregati avviene indistintamente in assenza ed in presenza di biotina, confermando l'ipotesi che l'interazione tra avidina e gli oligomeri si verifichi anche quando la tasca per la biotina risulta occupata.

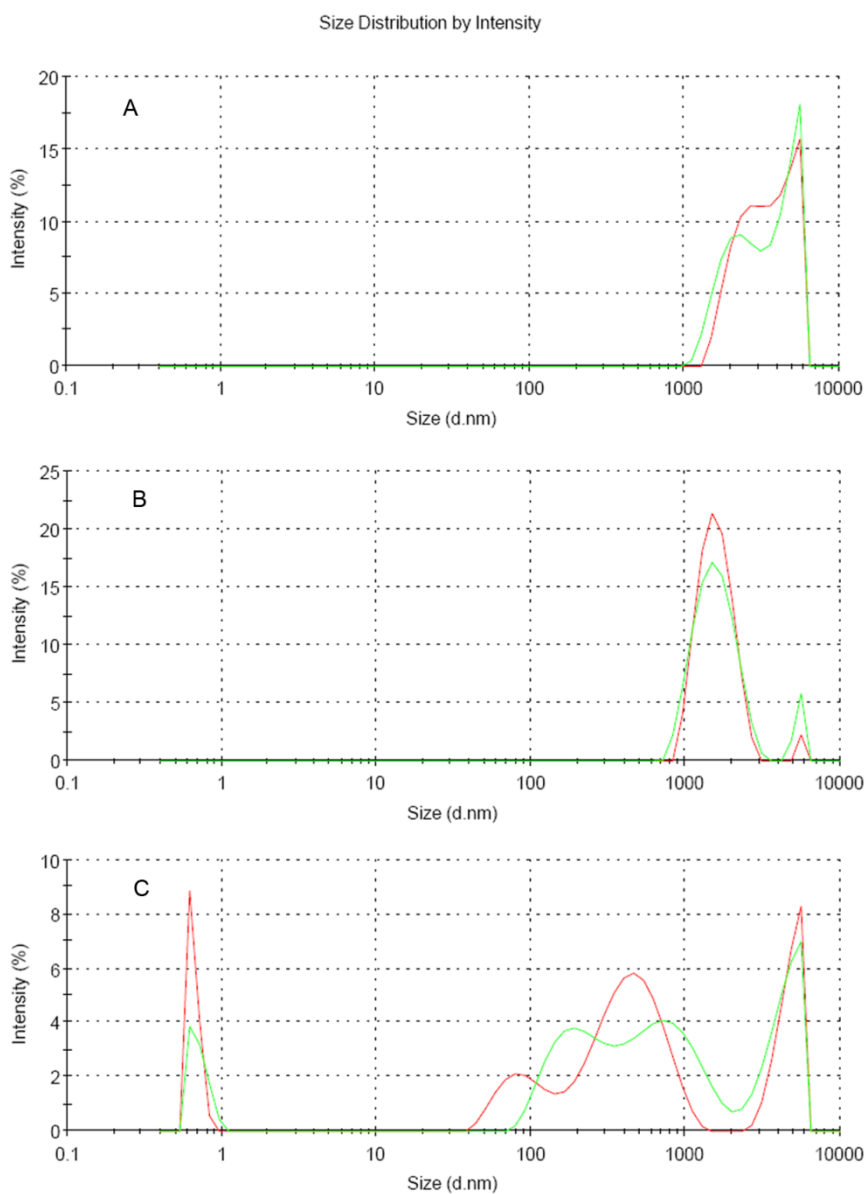


Figura 21. Distribuzione dimensionale di assemblati avidina-oligonucleotide G16 ottenuta mediante analisi di light scattering dinamico. I tre grafici corrispondono a campioni in cui la concentrazione di proteina è pari a 45,5 $\mu\text{g/ml}$ (A), 8,5 $\mu\text{g/ml}$ (B e C), prima (B) e dopo (C) centrifugazione a 15000 rpm.

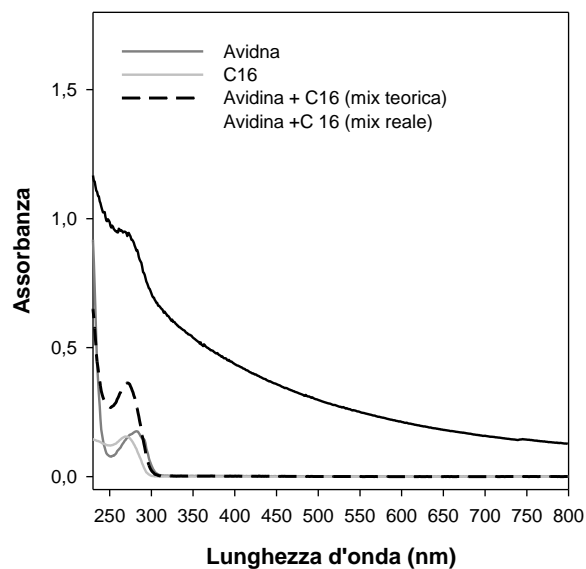


Figura 22. Confronto tra spettri di assorbimenti UV-VIS. La soluzione di avidina è stata preparata in tampone tris 50mM (50 µg/ml) e la soluzione di oligonucleotide è stata preparata in acqua (21,8 nmol/ml). Le soluzioni sono state quindi centrifugate separatamente e poi miscelate per formare l'assemblato. Lo spettro di quest'ultimo è significativamente più assorbente della somma matematica degli spettri delle due soluzioni di partenza, indicando la formazione di aggregati.

Tabella 15. Elenco dei campioni analizzati al light scattering dinamico. Per una corretta analisi sono stati presi in considerazione i valori del diametro espressi in distribuzione in intensità, numero e volume; l'indice di polidispersività (Pdl) e l'intensità della luce diffusa (Kcps).

| Campione | Aggregazione UV-Vis | diametro medio (nm) DLS | | | Qualità dato DLS | |
|-------------------------|---------------------|-------------------------|--------|--------|------------------|-------|
| | | Intensità | Numero | Volume | Pdl | Kcps |
| Avidina | no | 130,6 | 6,2 | 6,8 | 0,7 | 164,0 |
| Avidina-biotina | no | 8,4 | 4,6 | 5,6 | 0,5 | 52,2 |
| Avidina + A8 | si | 1180,0 | 26,73 | 1794 | 1,0 | 331,4 |
| Avidina + T8 | si | 551,9 | 393,4 | 697,2 | 0,4 | 115,5 |
| Avidina-biotina + A8 | no | 639,6 | 5,2 | 5,6 | 1,0 | 246,3 |
| Avidina-biotina + C8 | no | 252,2 | 2,5 | 3,1 | 0,4 | 74,8 |
| Avidina-biotina + G8 | si | 1313,0 | 213,1 | 1408,0 | 0,6 | 164,0 |
| Avidina-biotina + T8 | no | 360,6 | 7,1 | 7,5 | 0,6 | 62,4 |
| Avidina + A16 | si | 656,6 | 655,6 | 667,7 | 1,0 | 188,7 |
| Avidina + C16 | no | 234,2 | 0,7 | 0,7 | 1,0 | 67,7 |
| Avidina + G16 | si | 3887,0 | 1936,0 | 2404,0 | 0,3 | 162,6 |
| Avidina + T16 | si | 1104,0 | 1083,0 | 1124,0 | 0,9 | 250,7 |
| Avidina + C16-G16 | si | 943,3 | 897,9 | 980,1 | 0,9 | 190,2 |
| Avidina-biotina+C16-G16 | si | 1683,0 | 122,2 | 1767,0 | 0,4 | 97,6 |

Un pool selezionato dei prodotti dell'interazione sono stati anche analizzati al microscopio ottico. Nelle figure 24-27 sono riportate le immagini ottenute per alcuni di essi. Gli aggregati sembrano tutti possedere un aspetto organizzato ed in qualche caso cristallino, suggerendo la presenza di elevato ordine. Ciò potrebbe facilitare analisi cristallografiche ai raggi X che sono previste nel futuro in collaborazione con altri gruppi di ricerca.

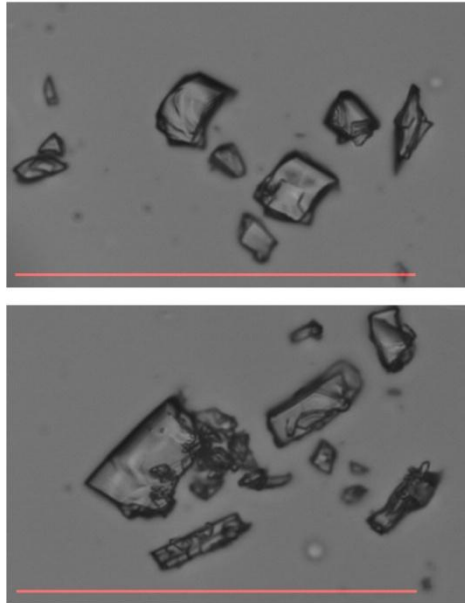


Figura 23. Analisi al microscopio ottico in contrasto di fase di aggregati di avidina+G16-C16, bar: 100 μm

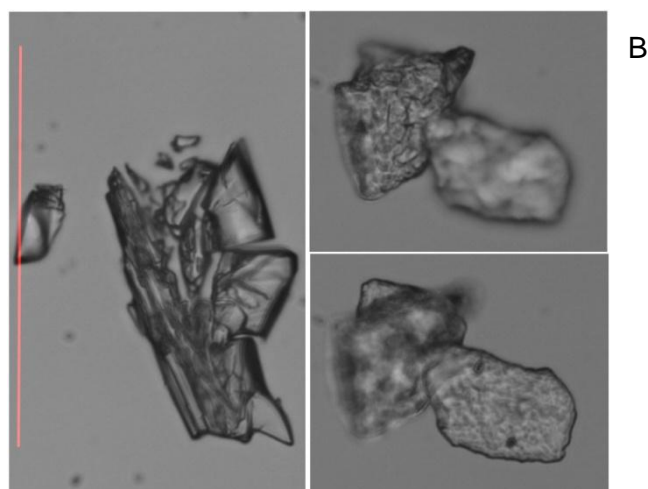


Figura 24. Analisi al microscopio ottico in contrasto di fase di aggregati Avidina+G16, bar: 100 μm

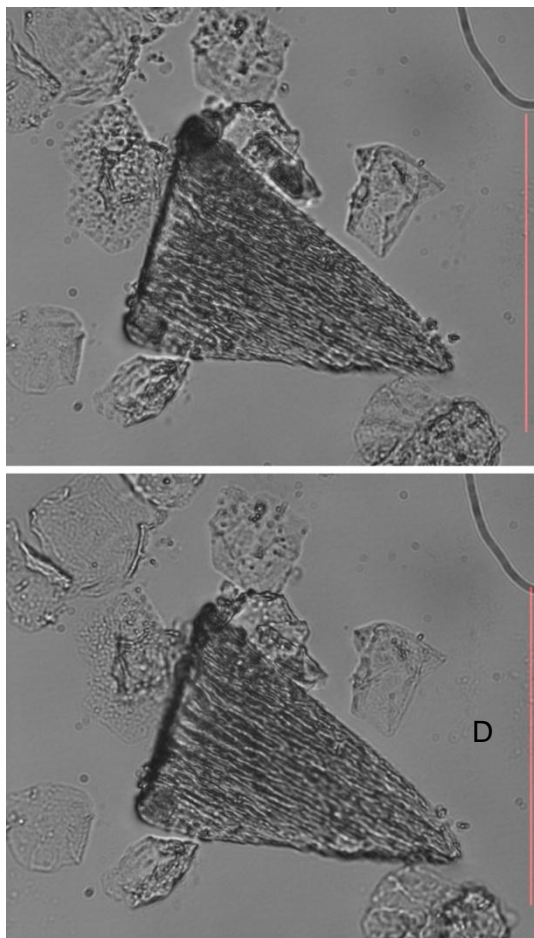


Figura 25. Analisi al microscopio ottico in contrasto di fase di aggregati Avidina+A16, bar: 100 μ m

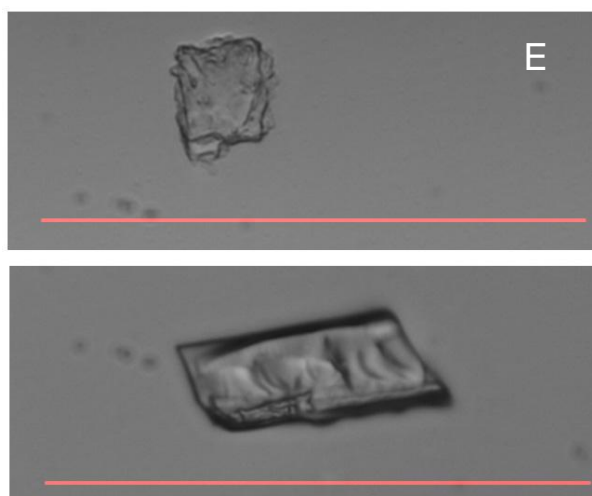


Figura 26. Analisi al microscopio ottico in contrasto di fase di Avidina-Biotina+ T8, bar 100 μ m.



Figura 27. Analisi al microscopio ottico in contrasto di fase di Avidina+T8; bar: 100 μm .

5.1.4. Prime indagini sulla specificità di legame con DNA a doppio filamento

I risultati ottenuti con gli oligomeri sintetici hanno evidenziato una maggiore affinità per gli oligonucleotidi costituiti da citosine e guanine, almeno per quanto riguarda i singoli filamenti. Al fine di verificare se tale vantaggio si riflette anche con DNA a doppio filamento e a lunga catena, sono stati condotti esperimenti EMSA su gel di agarosio confrontando tre diversi tipi di DNA per l'effetto ritentivo da parte di avidina. In particolare, l'avidina è stata miscelata in rapporti molari avidina-DNA crescenti con DNA plasmidico (sequenza da noi considerata "casuale") e con DNA sintetico a lunga catena costituito da poly G·C o poly GC·CG. Le immagini EMSA sono riportate in figura 28 e il risultato dell'analisi quantitativa dell'immagine è riportato in figura 32. Benché emergano piccole differenze nell'andamento delle curve di figura 29, esse non sono sufficienti per poter affermare che esista un'effettiva differenza di affinità per le diverse sequenze. Date però le costanti di dissociazione misurate per il DNA a doppio filamento (10^{-9} M), è possibile che i regimi di concentrazione adottati nell'esperimento (bp= $9,5 \times 10^{-6}$ M, che assumendo un sito di legame di 22,5 paia di basi corrisponde a $4,2 \times 10^{-7}$ M; avidina da $1,4 \times 10^{-6}$ M a $1,4 \times 10^{-7}$ M) non siano sufficientemente bassi da consentire la individuazione di differenze, se esistenti.

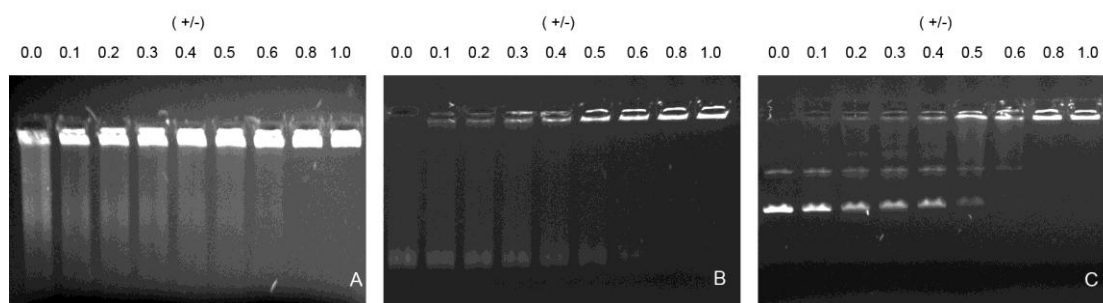


Figura 28. Saggio di mobilità elettroforetica (EMSA) mediante gel di agarosio. Sono stati testati tre acidi nucleici a doppio filamento ai diversi rapporti di carica +/- : A) DNA lineare poly G-C (7,2 Kbp); B) DNA lineare poly CG-GC (1,3 Kbp) e C) DNA plasmidico p-EGFP (4,7 Kbp).

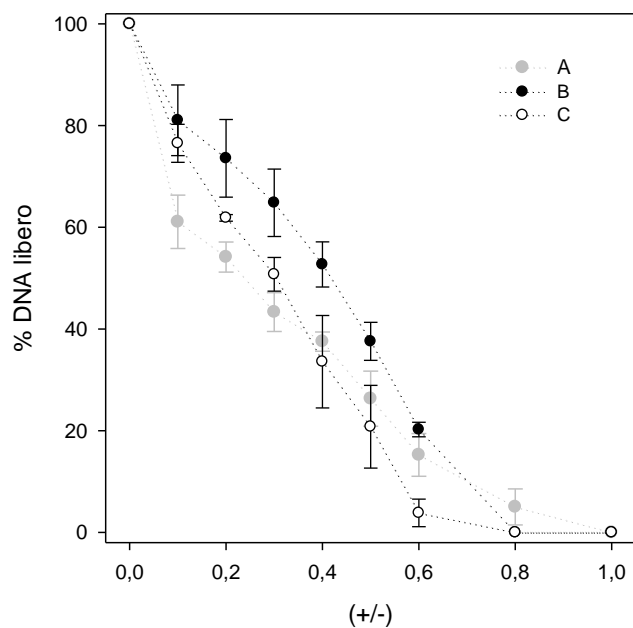


Figura 28. In questo grafico è rappresentata la diversa affinità di legame tra l'avidina e gli acidi nucleici di differente sequenza e lunghezza, ottenuti dalla valutazione della mobilità elettroforetica mediante EMSA, dove A è DNA lineare poly G-C (7,2 Kbp); B DNA lineare poly CG-GC (1,3 Kbp) e C DNA plasmidico p-EGFP (4,7 Kbp) nei diversi rapporti di carica +/- . Nell'esperienza, la quantità di acido nucleico è stata mantenuta costante a 6,25 µg/ml ed è stata variata la quantità di avidina da 0 a 90 µg/ml.

5.1.5. Effetto del PEG sull'affinità di avidina per il DNA

La capacità di avidina e di suoi derivati PEG-ilati di interagire con il DNA è stata indagata mediante saggi di variazione di mobilità elettroforetica (EMSA). La mobilità elettroforetica di una biomolecola all'interno di un gel non denaturante dipende dalla sua carica e dal suo peso molecolare. Se ad un acido nucleico viene aggiunta una molecola in grado di legarsi ad esso la mobilità elettroforetica del DNA dipenderà dalla dimensione e dalla carica del complesso formatosi. Nei saggi EMSA di seguito descritti avidina e i suoi derivati PEG-ilati sono stati mescolati con DNA plasmidico a differenti rapporti molari e quindi caricati nel gel (Morpurgo, Radu et al. 2004). L'analisi quantitativa della banda relativa al DNA non legato (DNA libero) ha permesso di stimare l'affinità relativa di avidina e dei suoi derivati PEG-ilati per il DNA.

Il PEG è stato legato alla proteina sfruttando due differenti strategie: mediante un legame covalente o sfruttando la formazione del complesso tra la proteina e dei derivati biotinilati del polimero (biotina-mPEG). Si è potuto risalire alla quantità di DNA libero misurando l'intensità di fluorescenza della rispettiva banda nel gel colorato con etidio bromuro. Sono state ottenute curve di *binding* in funzione del rapporto tra le cariche positive della proteina e le cariche negative dell'acido nucleico (rapporto +/-), parametro che viene comunemente usato nello studio delle DNA *binding proteins*.

Le caratteristiche dei derivati avidina-PEG testati nei saggi EMSA sono riportate in tabella 16.

Tabella 16. Avidina e suoi derivati PEG-ilati testati in saggi di tipo EMSA per la loro capacità di interagire con DNA plasmidico.

| Nome campione | Tipo di legame con PEG | PEG:AVIDIN (rapporto molare) | Aggiunta di biotina | % dei BBS Occupata |
|------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|
| Avidina | - | 0 | No | 0 |
| Avidina + 4 biotina | - | 0 | Si | 100 |
| Avidina-(mPEG ₅₀₀₀) _{0.9} | covalente | 0.9 | No | 0 |
| Avidina-(mPEG ₅₀₀₀) _{0.9} + 1 biotina | covalente | 1 | Si | 25 |
| Avidina-(mPEG ₅₀₀₀) _{1.2} | covalente | 1.2 | No | 0 |
| Avidina-(mPEG ₅₀₀₀) _{2.1} | covalente | 2.1 | No | 0 |
| Avidina + biotin-mPEG ₅₀₀₀ | complesso | 1 | No | 25 |
| Avidina-(mPEG ₅₀₀₀) _{3.6} | covalente | 3.6 | No | 0 |
| Avidina-(mPEG ₅₀₀₀) _{3.6} + 4 biotina | covalente | 3.6 | Si | 100 |
| Avidina + 4 biotin-mPEG ₅₀₀₀ | complesso | 4 | No | 100 |
| Avidina + 4 biotin-(mPEG ₅₀₀₀) ₂ | complesso | 4 | No | 100 |
| Avidina + 3 biotina-PEG ₅₀₀₀ -HRP | complesso | 3 | No | 75 |

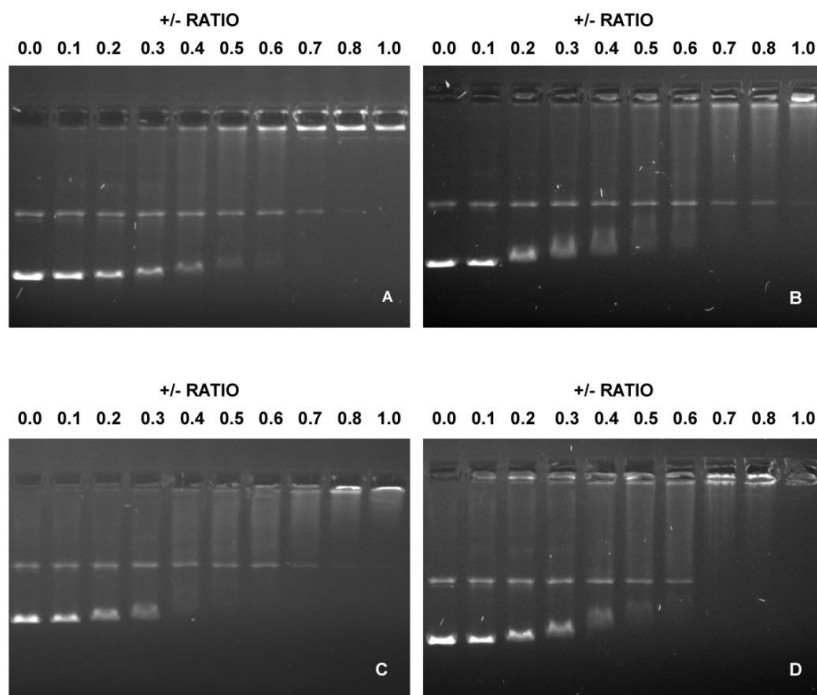


Figura 30. Saggio di mobilità elettroforetica EMSA in gel di agarosio sviluppato con etidio bromuro. Sono stati testati 4 diversi derivati avidina-mPEG e cioè: avidina (A), avidina-(mPEG)0.9 (B), avidina-(mPEG)0.9 + 1 biotina (C) e avidina + 1 biotina-mPEG5000 (D). Nell'esperimento, la quantità di acido nucleico è stata mantenuta costante a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ed è stata variata la quantità di avidina da 0 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

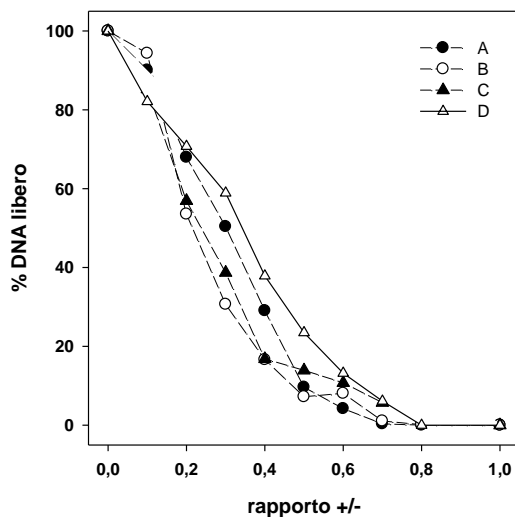


Figura 31. In questo grafico è rappresentata la diversa affinità per del DNA plasmidico pEGFP di diversi derivati avidina-mPEG. In questo esperimento sono stati testati i derivati a più basso contenuto in polimero tra quelli sintetizzati. Ciascuna curva corrisponde ad un derivato proteina-polimero e cioè: avidina (A), avidina-(mPEG)_{0.9} (B), avidina-(mPEG)_{0.9} + 1 biotina (C) e avidina + 1 biotina-mPEG₅₀₀₀ (D). Nell'esperimento, la quantità di acido nucleico è stata mantenuta costante a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ed è stata variata la quantità di avidina da 0 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

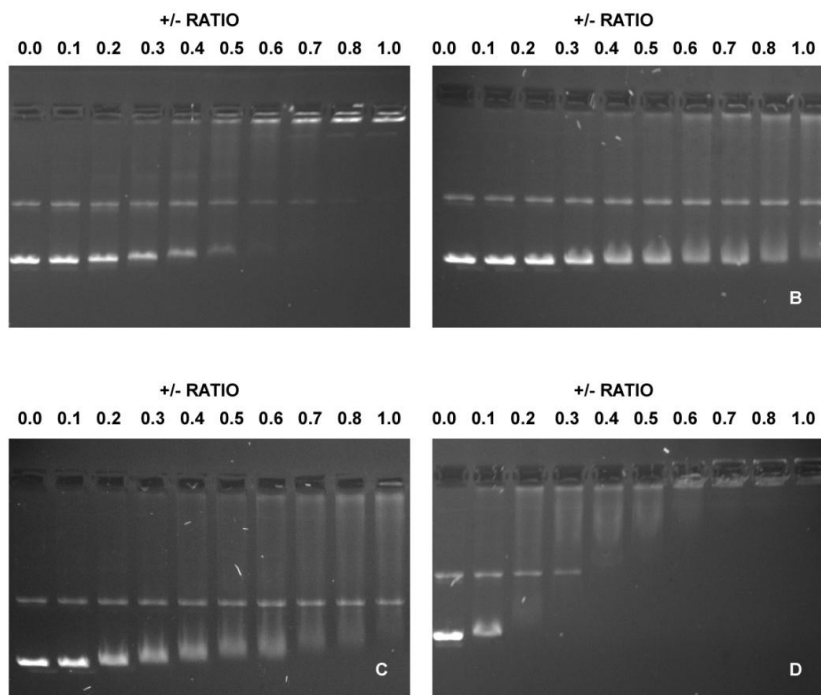


Figura 32. Saggio di mobilità elettroforetica EMSA in gel di agarosio sviluppato con etidio bromuro. Sono stati testati 4 diversi derivati avidina-mPEG e cioè: avidina + 4 biotina (A), avidina-(mPEG)3.6 (B), avidina-(mPEG)3.6 + 4 biotina (C) e avidina + 4 biotina-mPEG5000 (D). Nell'esperimento, la quantità di acido nucleico è stata mantenuta costante a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ed è stata variata la quantità di avidina da 0 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

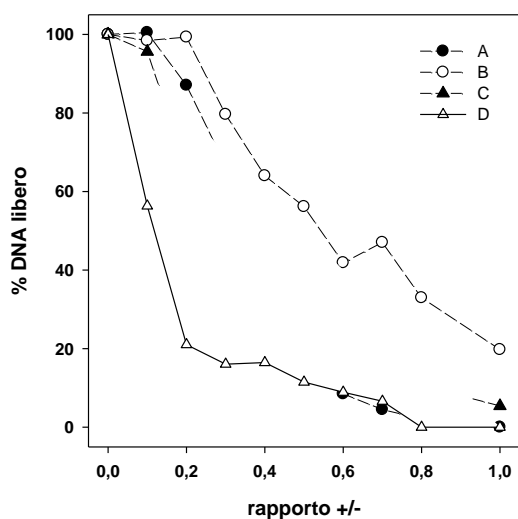


Figura 33. In questo grafico è rappresentata la diversa affinità per del DNA plasmidico pEGFP di diversi derivati avidina-mPEG. In questo esperimento sono stati testati i derivati a più elevato contenuto in polimero tra quelli sintetizzati. Ciascuna curva corrisponde ad un derivato proteina-polimero e cioè: avidina + 4 biotina (A), avidina-(mPEG)3.6 (B), avidina-(mPEG)3.6 + 4 biotina (C) e avidina + 4 biotina-mPEG5000 (D). Nell'esperimento, la quantità di acido nucleico è stata mantenuta costante a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ed è stata variata la quantità di avidina da 0 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

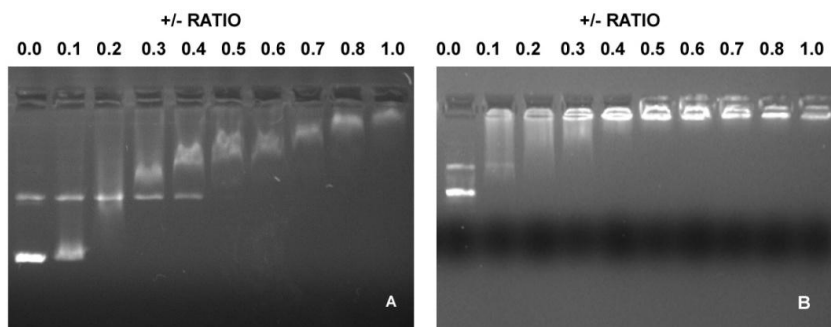


Figura 34. Saggio di mobilità elettroforetica EMSA in gel di agarosio sviluppato con etidio bromuro. Sono stati testati 4 diversi derivati avidina-mPEG e cioè: avidina + 4 biotina (A), avidina-(mPEG)3.6 (B), avidina-(mPEG)3.6 + 4 biotina (C) e avidina + 4 biotina-mPEG5000 (D). Nell'esperimento, la quantità di acido nucleico è stata mantenuta costante a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ed è stata variata la quantità di avidina da 0 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

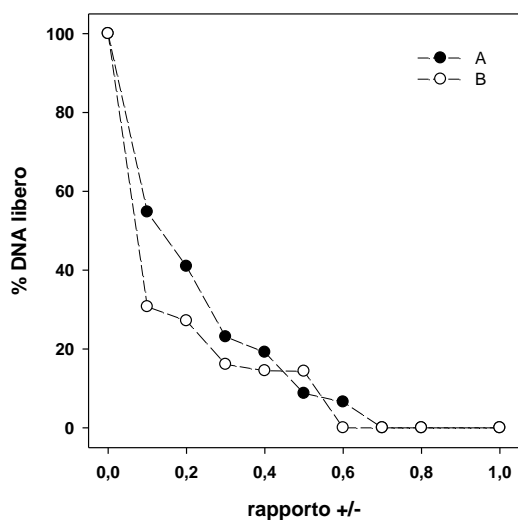


Figura 35. In questo grafico è rappresentata la diversa affinità per del DNA plasmidico pEGFP di due complessi tra avidina e derivati biotinilati molto ingombrati. La curva A è stata è stata ottenuta utilizzando avidina + 4 biotin-(mPEG5000)2 mentre la curva B ottenuta con Avidina + 3 biotina-PEG5000-HRP. Nell'esperimento, la quantità di acido nucleico è stata mantenuta costante a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ed è stata variata la quantità di avidina da 0 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

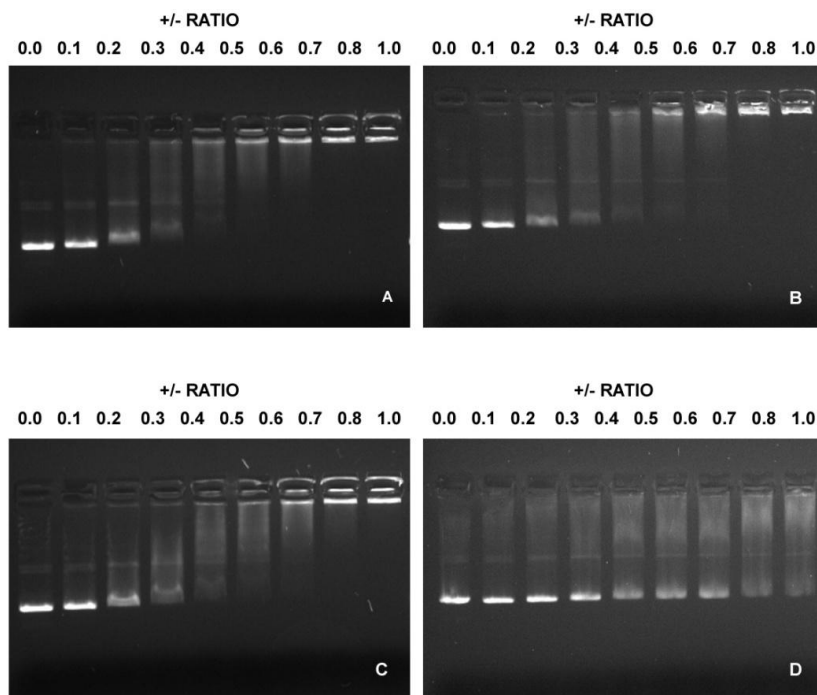


Figura 36. Saggio di mobilità elettroforetica EMSA in gel di agarosio sviluppato con etidio bromuro. Sono stati testati 4 diversi coniugati covalenti avidina-mPEG e cioè: avidina-(mPEG)0.9 (A), avidina-(mPEG)1.2 (B), avidina-(mPEG)2.1 (C) e avidina-(mPEG)3.6 (D). Nell'esperimento, la quantità di acido nucleico è stata mantenuta costante a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ed è stata variata la quantità di avidina da 0 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

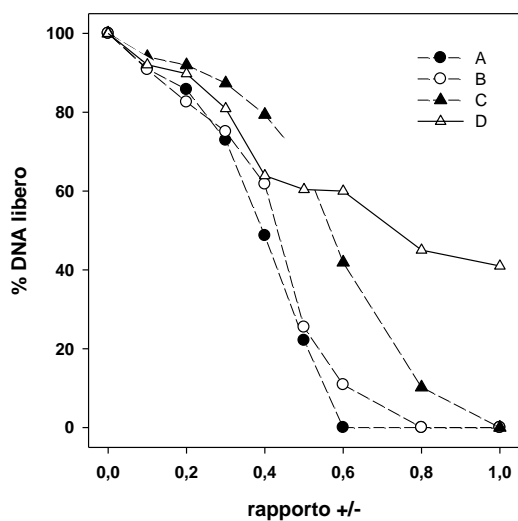


Figura 37. In questo grafico è rappresentata la diversa affinità di legame di 4 differenti coniugati avidina-mPEG per del DNA plasmidico pEGFP. Ciascuna curva corrisponde ad un coniugato a diverso rapporto molare proteina polimero e cioè avidina-(mPEG)0.9 (A), avidina-(mPEG)1.2 (B), avidina-(mPEG)2.1 (C) e avidina-(mPEG)3.6 (D), Nell'esperimento, la quantità di acido nucleico è stata mantenuta costante a 6,25 $\mu\text{g/ml}$ ed è stata variata la quantità di avidina da 0 a 90 $\mu\text{g/ml}$.

I risultati (figure 30-33) mostrano che, quando il polimero è attaccato ad avidina attraverso i siti di legame per la biotina, l'affinità per il DNA è totalmente preservata. L'apparente aumento di affinità osservato ad elevato caricamento in PEG è probabilmente indotto dall'inserimento della biotina nella sua tasca all'interno della proteina in maniera simile a quanto osservato dopo aggiunta di biotina ad avidina nativa (Morpurgo, 2004). Questo aumento di affinità è più evidente in condizioni non fisiologiche come, probabilmente, quelle indotte da biotina-mPEG derivati.

Al contrario quando il PEG è covalentemente legato ad avidina l'affinità del coniugato per il DNA diminuisce. Questa diminuzione ha un andamento direttamente correlato alla quantità di polimero (figure 36-37). Quando si ha una PEG per avidina la diminuzione di affinità è lieve mentre, ai più alti livelli di caricamento in polimero il calo di affinità è drammatico soprattutto se confrontato con i derivati PEG-ilati ottenuti con biotina-mPEG.

Anche se tutte le avidine covalentemente PEG-ilate sono in grado di interagire con il DNA questi risultati suggeriscono che la perdita di affinità indotta dal polimero può, verosimilmente, influenzare negativamente la stabilità in soluzione dei nanoassemblati avidina-DNA e quindi la loro applicabilità. Al contrario la PEG-ilazione ottenuta attraverso i siti di legame per la biotina sembra ottimale per la preparazione di nanoassemblati stabili in soluzione.

L'interazione non risulta negativamente influenzata neanche dall'aggiunta di derivati biotinilati altamente ingombrati come ad esempio biotina-PEG-HRP avente una massa di circa 47 KDa. (figura 34-35).

5.2. STUDIO DEI NANOASSEMBLATI AVIDINA-DNA

5.2.1 Dimensione dei nanoassemblati variando lunghezza e tipo di DNA

Avidina si autoassembla lungo una catena di DNA a doppio filamento secondo un preciso rapporto stechiometrico. Variando la lunghezza dell'acido nucleico utilizzato come nucleante è quindi possibile ottenere nanoassemblati caratterizzati da un differente rapporto avidina/particella, e ciò, verosimilmente, si andrà a riflettere sulla loro dimensione.

Nella tabella 17 sono riportate le dimensioni misurate mediante analisi di *dynamic light scattering* di nanoassemblati preparate con DNA plasmidico (circolare; 4,7 Kbp) e con DNA genomico frammentato (lineare; 24 Kbp) a differenti rapporti di carica +/-.

L'aumento dimensionale che si ottiene passando dal DNA plasmidico a quello genomico (5 volte più lungo) è mediamente di 50 nm. Ciò sembra in accordo con il modello di struttura dei nanoassemblati in cui l'acido nucleico si trova avvolto su se stesso in forma altamente condensata.

La polidispersività delle particelle ottenute con DNA genomico risulta essere maggiore, si ha infatti un aumento della deviazione standard percentuale che mediamente raddoppia. La causa di questa maggior polidispersività dimensionale è attribuibile alla preparazione del DNA stesso, ottenuto mediante frammentazione enzimatica di DNA genomico. Il DNA plasmidico, più omogeneo da un punto di vista dimensionale, porta alla formazione di particelle più omogenee.

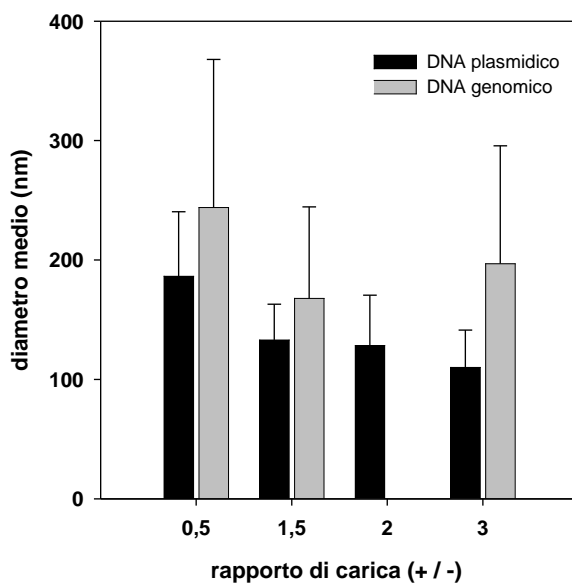


Figura 38. Dimensione media (intensity weighted gaussian analysis) di nanoassemblati avidina-DNA preparati a differente rapporto di carica utilizzando due tipi di DNA: plasmidico (4,7 Kbp) o genomico frammentato (24Kbp).

Tabella 17. Dimensione di nanoassemblati avidina-DNA ottenuti a differente rapporto di carica (+/-) utilizzando DNA plasmidico o genomico frammentato. I valori di diametro medio riportati sono stati ottenuti mediante intensity weighted gaussian analysis.

| Rapporto (+ / -) | Tipo DNA | Percentuale BBS occupata con biotina-(mPEG ₅₀₀₀) ₂ | Diametro medio (nm) | Deviazione standard percentuale |
|------------------|------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| 3.0 | Plasmidico | 0 | 110.1 ± 31.2 | 28.3 |
| 2.0 | Plasmidico | 0 | 128.4 ± 48.1 | 37.4 |
| 1.5 | Plasmidico | 0 | 133.1 ± 29.9 | 22.5 |
| 0.5 | Plasmidico | 0 | 186.5 ± 53.9 | 50.9 |
| 3.0 | Plasmidico | 30 | 121.3 ± 29.8 | 24.5 |
| 2.0 | Plasmidico | 30 | 127.2 ± 20.3 | 15.9 |
| 1.5 | Plasmidico | 30 | 132.5 ± 21.3 | 16.1 |
| 0.5 | Plasmidico | 30 | 120.9 ± 24.0 | 19.8 |
| 3.0 | Genomico | 0 | 196.9 ± 98.7 | 50.0 |
| 1.5 | Genomico | 0 | 157.9 ± 76.6 | 48.1 |
| 0.5 | Genomico | 0 | 244.0 ± 124.3 | 28.9 |
| 3.0 | Genomico | 30 | 138.8 ± 54.8 | 39.4 |
| 1.5 | Genomico | 30 | 168.8 ± 75.0 | 41.9 |
| 0.5 | Genomico | 30 | 179.8 ± 74.1 | 41.2 |

5.2.2. Purificazione dei nanoassemblati

Nelle condizioni impiegate per la preparazione dei nanoassemblati avidina-DNA non tutta la proteina utilizzata risulta legata all'agente nucleante e l'eccesso rimane in soluzione in forma non assemblata. E' quindi stato necessario per poter valutare l'efficienza analitica di questi nanosistemi andare a mettere a punto una metodica di purificazione che permettesse la rimozione della avidina libera.

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti utilizzando differenti tecniche di purificazione e cioè:

cromatografia di esclusione dimensionale

ultrafiltrazione in centrifuga

ultrafiltrazione in micro cella

filtrazione a flusso tangenziale

5.2.2.a. Purificazione mediante cromatografia di esclusione dimensionale

Questa tecnica cromatografica permette di separare molecole aventi differente peso molecolare in virtù della loro diversa propensione a penetrare all'interno dei pori presenti nella fase stazionaria. Per separare avidina non assemblata il cui raggio idrodinamico è di circa 6 nm dai nanoassemblati avidina-DNA aventi una dimensione superiore ai 100 nm è stata scelta come fase stazionaria una resina commerciale sephacryl-S1000 Superfine (GE Healthcare). Questa resina, appositamente studiata per la purificazione di virus, è in grado di escludere particelle sferiche aventi diametro compreso tra i 100 e i 400 nm.

Sono stati preparati nanoassemblati avidina-DNA genomico a differente rapporto di carica. Per prevenire l'aggregazione delle particelle in soluzione tamponata e per visualizzarne il comportamento cromatografico sono stati saturati il 30% dei BBS con biotina-(PEG₅₀₀₀)₂ e il 2% dei BBS con il fluoroforo biotinilato ALEXA⁵⁴⁶.

Il cromatogramma relativo all'eluizione in PBS dei nanoassemblati è stato quindi confrontato (figura 39) con quello ottenuto con avidina. Il profilo cromatografico dei tre campioni eluiti non mostra apprezzabili differenze. Non è mai stato possibile mediante questa tecnica discriminare tra avidina assemblata e avidina libera. In questa sede non sono stati effettuati ulteriori esperimenti finalizzati a chiarire le cause di questo comportamento, si è invece proceduto alla ricerca di alternativi metodi di purificazione.

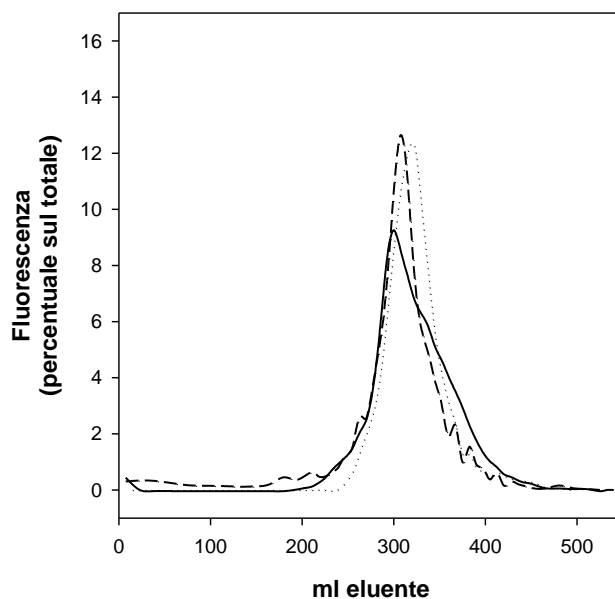


Figura 39. Cromatogrammi ottenuti mediante analisi fluorescente delle frazioni raccolte dopo eluizione su colonna sephacryl S-1000 (diametro: 4cm, altezza: 70 cm), eluente: PBS, flusso: 1,5 ml/minuto. Le tre curve corrispondono al cromatogramma ottenuto iniettando avidina (linea tratteggiata), nanoassemblati a rapporto +/- = 3,0 (linea piena) e nanoassemblati a rapporto +/- =2,0 (puntini). In tutti i campioni il 30% dei BBS è stato saturato con biotina-(PEG₅₀₀₀)₂ e il 2% dei BBS con il fluoroforo biotilato ALEXA⁵⁴⁶. I cromatogrammi sono stati ottenuti sulla base della fluorescenza normalizzata sul totale del segnale in uscita dalla colonna.

5.2.2.b. Purificazione mediante ultrafiltrazione in centrifuga

La purificazione dei nanoassemblati avidina-DNA è stata effettuata utilizzando dei sistemi per ultrafiltrazione da centrifuga costituiti da una provetta in polipropilene e un filtro in cellulosa rigenerata avente cut-off pari a 100 KDa che permette di rimuovere la proteina non assemblata, eliminata con il filtrato, trattenendo la proteina legata al DNA. Sono state purificati dei nanoassemblati preparati a rapporto di carica +/- = 3.0 in cui il 30% dei BBS è stato saturato con biotina-(PEG₅₀₀₀)₂ e un ulteriore 2% dei BBS con il fluoroforo biotilato ALEXA⁵⁴⁶. L'analisi in fluorescenza del materiale filtrato dopo ciascun ciclo di diluizione-centrifugazione-concentrazione ha permesso di ottenere il profilo di purificazione riportato in figura 40. La soluzione trattenuta, contenente i nanoassemblati purificati, è stata infine recuperata ed analizzata. La quantità di avidina recuperata nel surnatante risulta pari al 29% dell'avidina totale mentre la quantità di proteina recuperata nel filtrato risulta pari al 57%. Questo dato sembra in accordo con la stechiometria dell'interazione secondo cui una proteina si trova legata all'acido nucleico ogni 22 paia di basi. La caratterizzazione dimensionale del campione

purificato mediante *dynamic light scattering* ha messo in evidenza una popolazione di particelle avente diametro superiore a quello iniziale. Il diametro delle particelle purificate infatti supera i 300 nm. Secondariamente alla concentrazione mediante centrifugazione delle particelle intervengono fenomeni di tipo aggregativo.

La purificazione mediante ultrafiltrazione in centrifuga non si è rivelata particolarmente efficiente. La rimozione di avidina non assemblata si consegue infatti solo dopo numerosi cicli di purificazione, il campione subisce un elevato numero di centrifugazioni che portano alla formazione di aggregati non più solubili i quali intasano il sistema filtrante riducendone ulteriormente l'efficienza. Alla luce di ciò questa tecnica è stata scartata.

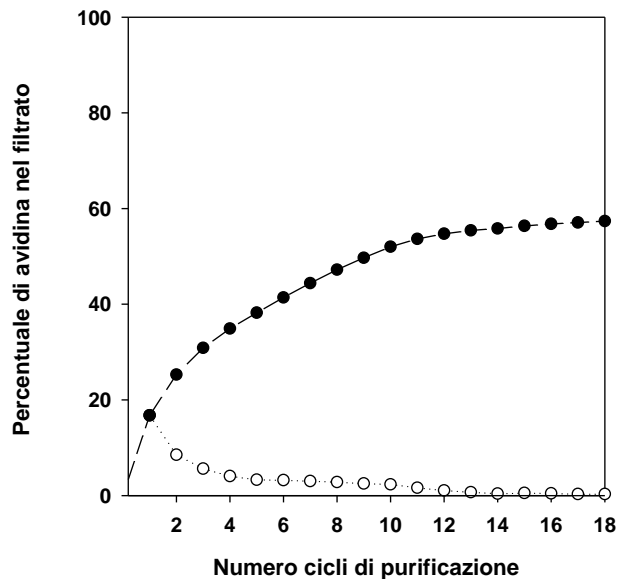


Figura 40. Profilo di purificazione di nanoassemblati avidina-DNA plasmidico ottenuto mediante ultrafiltrazione in centrifuga. Le due curve rappresentano la percentuale di avidina sul totale recuperato presente in ciascuna frazione (pallini vuoti) e cumulativa (pallini pieni).

5.2.2.c. Purificazione mediante ultrafiltrazione in microcella

La purificazione dei nanoassemblati avidina-DNA preparati in eccesso di avidina è stata effettuata utilizzando una microcella per ultrafiltrazione. Sono state purificati dei nanoassemblati preparati a rapporto di carica $\pm = 3.0$ in cui il 30% dei BBS è stato saturato con biotina-(PEG₅₀₀₀)₂ e un ulteriore 25% dei BBS con il fluoroforo biotinilato ALEXA⁵⁴⁶. Il sistema filtrante, costituito da una membrana in polietersolfone (PES) con un cut off di 500 KDa, ha permesso di rimuovere la proteina non assemblata che viene eliminata con il filtrato e di trattenere la proteina legata al DNA. Cicli di diluizione-concentrazione sono stati ripetuti finché l'analisi in fluorescenza non ha più rilevato

avidina nella soluzione filtrata. La soluzione trattenuta, contenente i nanoassemblati purificati, è stata infine recuperata ed analizzata.

L'analisi in fluorescenza del campione trattenuto ha permesso di risalire alla quantità di avidina trattenuta che risulta pari al 29% del totale. Questo dato sembra in accordo con la stechiometria dell'interazione secondo cui una proteina si trova legata all'acido nucleico ogni 22 paia di basi.

Misure di *dynamic light scattering*, riportate in tabella 18, hanno mostrato nel campione purificato la copresenza in soluzione di due popolazioni di nanoparticelle aventi un diametro medio rispettivamente pari a 136,6 nm e 13,0 nm. Le particelle più grandi corrispondono da un punto di vista dimensionale a quelle presenti in soluzione prima della purificazione mentre le particelle più piccole sono con ogni probabilità costituite da frammenti di particelle. Durante la purificazione in cella è infatti necessario mantenere costantemente la soluzione agitata con uno *stirrer* magnetico. Lo stress meccanico prodotto dalla prolungata agitazione causa una rottura dei nanoassemblati. Ciononostante il campione purificato è stato ugualmente testato in un saggio di *dot blot* fluorescente per valutarne l'efficacia analitica (vedi paragrafo 5.2.3.1).

La purificazione in cella non ha permesso di ottenere dei nanoassemblati purificati senza alterarne irreversibilmente la struttura. A questo problema si va a sommare la scarsa riproducibilità dei risultati ottenuti con questo metodo che è stato quindi a sua volta scartato.

Tabella 18. Dimensione dei nanoassemblati avidina-DNA plasmidico misurate prima e dopo la purificazione in cella per ultrafiltrazione.

| Campione | Diametro medio (nm) | % intensità | Diametro medio (nm) | % intensità |
|-----------------------------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|
| Nanoassemblati pre purificazione | 107,4 | 100 | - | - |
| Nanoassemblati post purificazione | 133.6 | 97.7 | 13.0 | 2.3 |

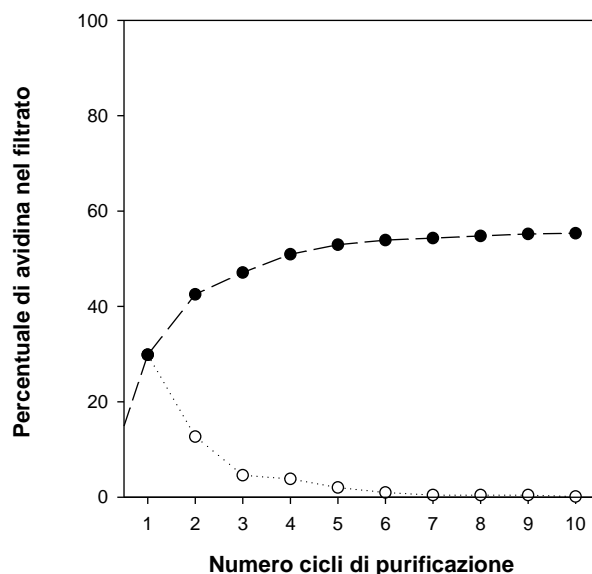


Figura 41. Profilo di purificazione di nanoassemblati avidina-DNA plasmidico in cella per ultrafiltrazione. Le due curve rappresentano la percentuale di avidina sul totale recuperato presente in ciascuna frazione (o) e cumulativa (•).

5.2.2.d. Purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale

La filtrazione a flusso tangenziale (TFF) è una particolare tecnica di filtrazione in cui la soluzione da purificare viene fatta scorrere all'interno di un filtro di forma tubulare. A differenza della classica filtrazione in cui la soluzione viene spinta perpendicolarmente al filtro, nella filtrazione a flusso tangenziale la soluzione scorre all'interno del circuito filtrante parallelamente al filtro stesso. Il flusso trans membrana è dovuto ad una lieve pressione positiva generata all'interno del circuito. Questa tecnica è stata scelta poiché permette di prevenire la formazione di aggregati sulla superficie della membrana che viene lavata in continuo dalla soluzione che scorre nel circuito.

Utilizzando un sistema costituito da una pompa peristaltica collegata ad una cartuccia per TFF commerciale (Vivaflow 50, Sartorius Stedim) con una membrana in cellulosa rigenerata avente un cut-off di 100 KDa è stato possibile andare a purificare una soluzione di nanoassemblati avidina-DNA. La soluzione filtrata è stata raccolta e analizzata mediante fluorescenza per quantificare la proteina libera non legata al DNA. In figura 42 è riportato il profilo di purificazione ottenuto. La soluzione trattenuta all'interno del circuito, contenente i nanoassemblati purificati, è stata analizzata sia mediante spettroscopia di fluorescenza che mediante dynamic light scattering per determinare rispettivamente la quantità e la dimensione del materiale post purificazione. La distribuzione dimensionale dei nanoassemblati (tabella 19) purificati mostra la presenza in due distinte popolazioni aventi diametro rispettivamente pari a

120 nm e 600 nm. Parte delle particelle quindi rimane inalterata e mantiene lo stesso diametro medio prima e dopo il processo di purificazione mentre una frazione di particelle mostra secondariamente alla rimozione dell'avidina in eccesso un aumento di dimensione. Ciò può essere legato a una parziale aggregazione e/o a un rilassamento della struttura condensata dei nanoassemblati indotta dalla rimozione dell'eccesso di avidina.

La soluzione purificata è stata utilizzata in un saggio di *dot blot* a rivelazione enzimatica (5.2.3.2) per valutarne l'efficienza analitica rispetto al sistema avidina-biotina classico.

Tabella 19. Dimensione dei nanoassemblati avidina-DNA plasmidico misurate prima e dopo la purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale.

| Campione | Diametro medio (nm) | % intensità | Diametro medio (nm) | % intensità |
|-----------------------------------|---------------------|-------------|---------------------|-------------|
| Nanoassemblati pre purificazione | 112.8 | 100 | - | - |
| Nanoassemblati post purificazione | 129.7 | 12.4 | 599.2 | 87.6 |

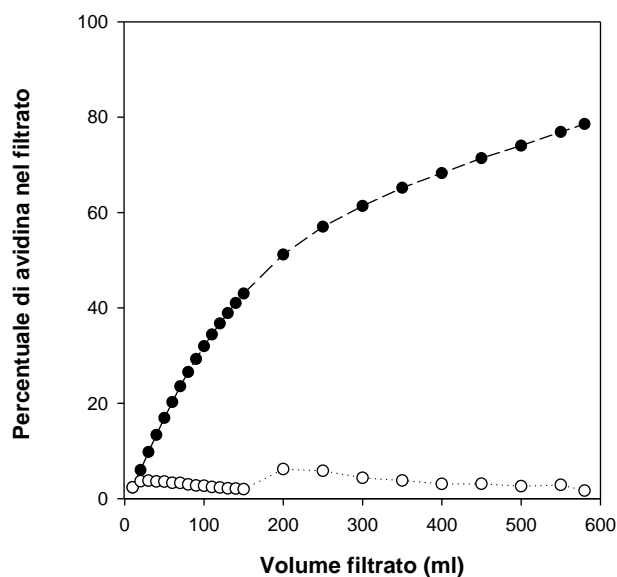


Figura 42. Profilo di purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale di nanoassemblati avidina-DNA. Il campione, preparato utilizzando DNA plasmidico, ha il 30% dei BBS saturati con biotina-(PEG5000)₂ e il 2 % saturato con biotina-Alexa546. Le due curve rappresentano la percentuale di avidina sul totale recuperato presente in ciascuna frazione (o) e cumulativa (•).

Tabella 20. In questa tabella sono riassunti i dati relativi la purificazione di nanoassemblati avidina-DNA effettuata con le differenti tecniche testate.

| Tecnica di purificazione | Cromatografia esclusione dimensionale | Ultrafiltrazione in centrifuga | Ultrafiltrazione in microcella | Filtrazione a flusso trasversale |
|----------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|
| Diametro post purificazione (nm) | 130 | 300 | 13 e 133 | 130 e 600 |
| % avidina totale recuperata | 100 | 86 | 88 | 60 |
| % avidina assemblata | 0 | 29 | 29 | 13 |
| Note | Purificazione fallita | Aggregazione degli assemblati | Rottura degli assemblati | Aggregazione e parziale degli assemblati |
| Costo purificazione | Basso | Basso | Basso | Elevato |
| Tempo richiesto | 3 ore | 2 giorni | 4 ore | 1 ora |

5.2.3. Efficacia in vitro dei nanoassemblati

Nelle analisi di tipo immunodiagnostico in vitro viene associato ad un evento di riconoscimento specifico lo sviluppo di un segnale (luce, fluorescenza, radiazioni, ecc.) Il sistema avidina-biotina è sfruttato per unire molecole segnale con molecole direzionanti. Limite di questo sistema è il numero massimo (4) di molecole biotinilate che possono essere legate ad avidina. Utilizzando dei sistemi poliavidinici come i nanoassemblati in esame è possibile in linea teorica associare ad un singolo evento di riconoscimento un numero molto maggiore di molecole segnale. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti confrontando il comportamento di avidina e avidina nanoassemblata in saggi immunodiagnostici modello utilizzando due differenti sistemi di rivelazione: fluorescente o enzimatica. Nel primo caso la molecola generante segnale è una piccola molecola fluorescente biotinilata (biotina-Alexa⁵⁴⁶, 1200 Dalton), nel secondo caso alle particelle è stata legata una più ingombrante perossidasi coniugata a biotina (biotina-PEG-HRP, 47 KDa).

5.2.3.a. Efficacia dei nanoassemblati purificati in dot blot fluorescente

I nanoassemblati avidina-DNA purificati mediante ultrafiltrazione (paragrafo ###) sono stati utilizzati in un test di *dot blot* con rivelazione fluorescente al fine di verificarne l'efficacia rispetto ad avidina monomerica. Si è utilizzato come analita modello un immunoglobulina G previamente biotinilata che è stata immobilizzata in differenti quantità su una membrana di nitrocellulosa. Tale membrana è stata quindi incubata in una soluzione contenente i nanoassemblati marcati con biotina-Alexa⁵⁴⁶. Per confronto una membrana identica è stata invece incubata in una soluzione di avidina analogamente marcata con lo stesso fluoroforo biotinilato. Successivamente le membrane sono state fotografate utilizzando un microscopio a fluorescenza. L'integrazione del segnale sviluppato in funzione della quantità di analita immobilizzato ha permesso di ottenere il grafico riportato in figura 43 dove si nota che, soprattutto a basse concentrazioni di analita, il sistema nanoassemblato produce una quantità di segnale maggiore rispetto ad avidina monomerica. L'amplificazione di segnale prodotta, di circa 10 volte, risulta inferiore alla amplificazione massima attesa. Nel campione utilizzato in questo saggio erano copresenti frammenti di particelle e/o avidina libera che in virtù della loro minore dimensione e maggior coefficiente di diffusione sono in grado di interferire sensibilmente sulla performance analitica. Appare quindi indispensabile al fine di ottenere la massima efficacia di rivelazione ottenere soluzioni di nanoassemblati non contaminate da avidina non assemblata o da frammenti di particelle.

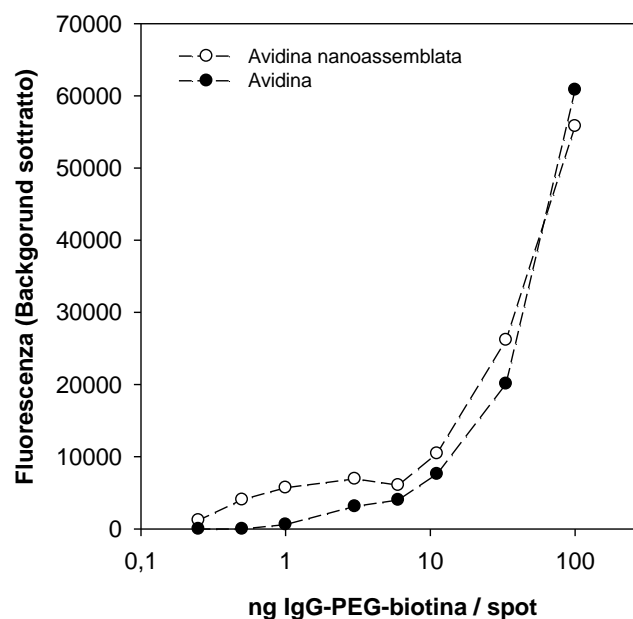


Figura 43. Segnale fluorescente sviluppato in funzione della quantità di analita biotinilato immobilizzato su membrana di nitrocellulosa in un esperimento di dot blot a rivelazione fluorescente. Le due curve si riferiscono al segnale prodotto utilizzando avidina nanoassemblata (o) o avidina monomerica (*).

5.2.3.b. Efficacia dei nanoassemblati purificati in dot blot a rivelazione enzimatica

I nanoassemblati avidina-DNA purificati mediante filtrazione a flusso tangenziale (sono stati utilizzati in un test di *dot blot* con rivelazione enzimatica al fine di verificarne l'efficacia rispetto ad avidina monomerica. Si è utilizzato come analita modello un immunoglobulina G previamente biotinilata che è stata immobilizzata a concentrazione decrescente su una membrana di nitrocellulosa. Tale membrana è stata quindi incubata in una soluzione contenente i nanoassemblati purificati. Per confronto una membrana identica è stata invece incubata in una soluzione di avidina nativa. Dopo un secondo step di incubazione in una soluzione contenente della perossidasi biotinilata le membrane sono state sviluppate immergendole in una soluzione contenente il substrato cromogenico DAB. L'integrazione del segnale sviluppato in funzione della quantità di analita immobilizzato ha permesso di ottenere il grafico riportato in figura 44.

Come atteso, il sistema nanoassemblato produce una quantità di segnale maggiore rispetto ad avidina monomerica a tutte le concentrazioni di analita testate. Il limite di rilevabilità ottenuto utilizzando i nanoassemblati purificati è circa 40 volte più basso. Avidina infatti non produce un segnale apprezzabile a concentrazione di analita biotinilato inferiore ai 0,6 ng/spot, mentre i nanoassemblati producono un segnale positivo anche a 0,016 ng/spot.

Le particelle purificate mediante filtrazione a flusso tangenziale hanno quindi performance analitiche superiori rispetto a quelle purificate sfruttando la classica ultrafiltrazione.

La efficace rimozione di avidina non assemblata è quindi indispensabile affinché l'efficacia analitica di questi sistemi risulti massima tuttavia, quale che sia il sistema di purificazione utilizzato, una rimozione totale della componente proteica non assemblata non sembra raggiungibile poiché impedito dalla legge di azione di massa.

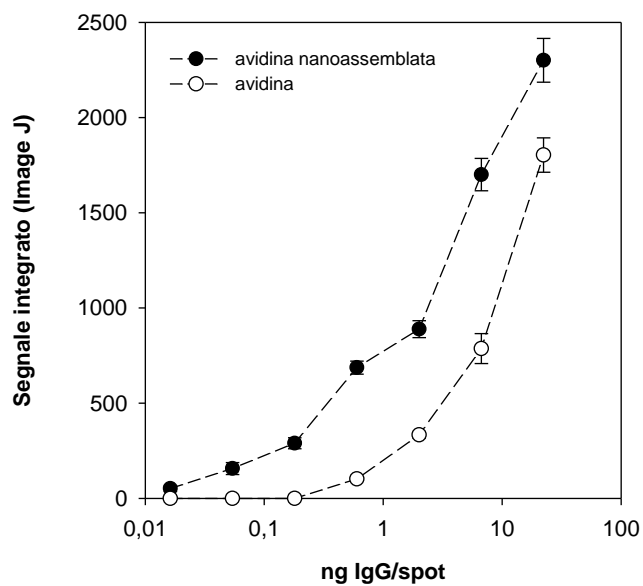


Figura 44. Segnale sviluppato in funzione della quantità di analita biotinilato immobilizzato su membrana di nitrocellulosa in un esperimento di dot blot a rivelazione enzimatica. Le due curve si riferiscono al segnale prodotto utilizzando avidina nanoassemblata (●) o avidina monomerica (○).

5.3. STUDIO DEI NANOASSEMBLATI AVIDINA-DNA STABILIZZATI

5.3.1. Purificazione dei nanoassemblati stabilizzati

5.3.1.a. Purificazione mediante ultrafiltrazione in micro cella

Nella figura 45 è riportato il profilo di purificazione ottenuto utilizzando un sistema per ultrafiltrazione con micro cella per purificare dei nanoassemblati stabilizzati preparati a rapporto di carica (+/-) pari a 3. La membrana in polietereosolfone utilizzata (MWCO 500KDa) ha permesso la rimozione dell'avidina libera, eliminata col filtrato. Circa il 65% della proteina è recuperata nel filtrato, la rimanente è trattenuta nella cella. Ciò sembra in accordo con la stechiometria dell' interazione avidina-DNA.

Dopo ciascun ciclo di concentrazione-diluizione parte della soluzione contenente le nanoparticelle è stata prelevata, analizzata mediante dynamic light scattering e testata in saggi di tipo ELISA.

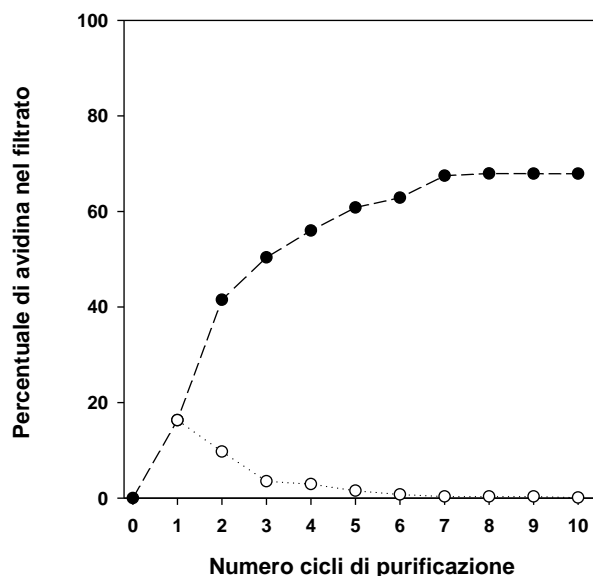


Figura 45. Profilo di purificazione mediante ultrafiltrazione in microcella di nanoassemblati stabilizzati avidina-DNA. Il campione, preparato utilizzando DNA plasmidico, ha il 25% dei BBS saturati con biotina-(PEG₅₀₀₀)₂. La quantità di avidina presente nel filtrato è stata determinata mediante analisi di assorbimento UV. Le due curve si riferiscono al segnale prodotto utilizzando avidina nanoassemblata (o) o avidina monomerica (•).

L'analisi dimensionale dei nanoassemblati stabilizzati effettuata prima, durante e dopo la purificazione non ha messo in evidenza una apprezzabile variazione del diametro medio. Da un punto di vista dimensionale le formulazioni stabilizzate sottoposte a questo tipo di processo di purificazione si sono dimostrate stabili. Il comportamento

analitico in saggi di tipo ELISA degli assemblati non/parzialmente o completamente purificati mediante ultrafiltrazione è discusso al paragrafo 5.3.2.2.

5.3.1.b. Purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale

I nanoassemblati stabilizzati sono stati purificati anche mediante filtrazione a flusso tangenziale. In figura 46 è riportato il profilo di purificazione ottenuto andando a quantificare la quantità di proteina recuperata nel filtrato utilizzando una cartuccia filtrante (Vivaflow 50, Sartorius Stedim) con una membrana in cellulosa rigenerata (cut-off 100KDa). Questo processo permette la rimozione di avidina non assemblata, eliminata nel filtrato, in maniera molto più rapida rispetto all'ultrafiltrazione. Ciò, unito alla relativamente semplice scalabilità di questo metodo può risultare utile nella preparazione di elevate quantità di nanoparticelle.

Da un punto di vista dimensionale le particelle stabilizzate sono risultate identiche prima e dopo la purificazione, inoltre il recupero in avidina assemblata è stato pressochè quantitativo.

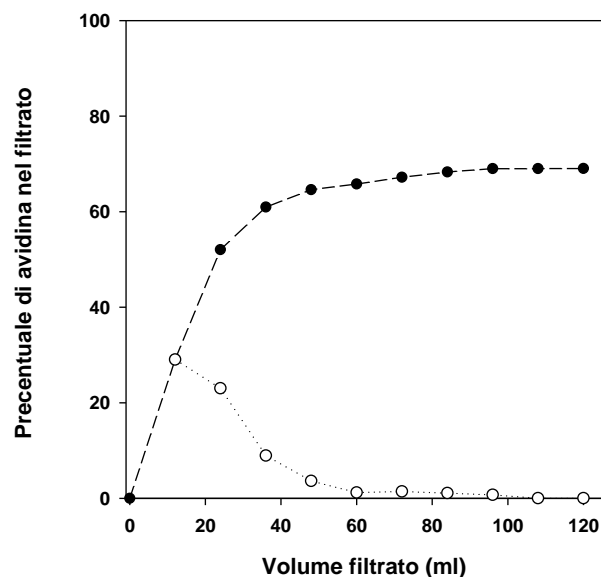


Figura 46. Profilo di purificazione mediante filtrazione a flusso tangenziale di nanoassemblati stabilizzati avidina-DNA. Il campione, preparato utilizzando DNA plasmidico, ha il 25% dei BBS saturati con biotina-(PEG₅₀₀₀)₂. La quantità di avidina presente nel filtrato è stata determinata mediante analisi di assorbimento UV. Le due curve si riferiscono al segnale prodotto utilizzando avidina nanoassemblata (o) o avidina monomerica (•).

Questa tecnica di purificazione, pur permettendo una rapida ed efficiente purificazione anche di lotti di grandi dimensioni, richiede l'utilizzo di sistemi filtranti monouso, il cui costo ha un elevato impatto su preparazioni in piccola scala da laboratorio.

5.3.2. Efficacia *in vitro* dei nanoassemblati stabilizzati

L'efficacia di amplificazione delle nanoparticelle stabilizzate rispetto ad avidina monomerică è stata testata in un saggio immunoenzimatico (ELISA) nel quale si è andati rilevare/quantificare la presenza di un analita biotinilato immobilizzato micropietra in quantità decrescenti sulla superficie dei pozzetti. L'efficacia amplificatoria delle nanoparticelle è stata testata in funzione dei seguenti parametri:

- Il tipo e la quantità del PEG utilizzato nel coating superficiale delle particelle;
- Il grado di contaminazione di avidina non assemblata (grado di purificazione);
- Il tempo di conservazione (fino a 50 giorni).

5.3.2.a. Effetto del tipo e della quantità di PEG

Al fine di prevenire l'aggregazione dei nanoassemblati la loro superficie è stata funzionalizzata con derivati biotina-mPEG di differente dimensione (5 KDa o 10KDa) e quantità. I nanoassemblati stabilizzati si sono rivelati meno propensi all'aggregazione in soluzione che è stata prevenuta utilizzando quantità di biotina-mPEG minori rispetto a quelle utilizzate nelle formulazioni di nanoassemblati non stabilizzate.

In particolare il 12% o il 25% dei siti per la biotina totali sono stati saturati con il polimero.

Tutte le composizioni testate hanno dimostrato un comportamento superiore rispetto ad avidina monomerică (figura 47), tuttavia l'efficacia risulta influenzata dalla quantità di PEG utilizzato per il coating superficiale. La miglior performance infatti si ottiene riducendo la quantità e la dimensione di polimero.

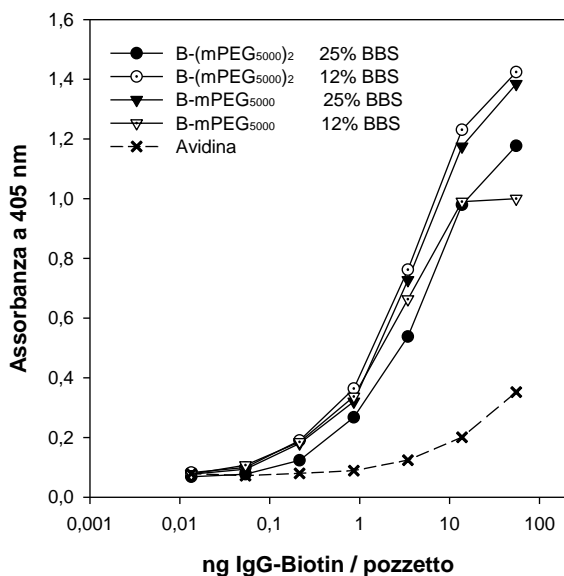


Figura 47. Segnale sviluppato in un saggio ELISA variando la quantità di analita. La detection è stata effettuata usando 4 differenti formulazioni di nanoassemblati stabilizzati rivestiti con biotina-mPEG₅₀₀₀ o con biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂ saturando il 12% o il 25% dei siti per la biotina totali (BBS). La linea tratteggiata si riferisce alla detection effettuata con avidina nativa non assemblata.

5.3.2.b. Effetto del grado di purezza

In figura 48 sono riportati i dati ottenuti in un saggio ELISA effettuato utilizzando soluzioni di particelle a differente grado di purificazione (da 0 a 10 cicli di ultrafiltrazione) Il processo di purificazione mediante ultrafiltrazione è descritto al paragrafo 5.3.3.1. I risultati ottenuti hanno dimostrato l'importanza del grado di purezza sulle potenzialità di amplificazione dei nanoassemblati. La contaminazione con avidina libera riduce in maniera sensibile la performance delle particelle. In una soluzione non sufficientemente purificata avidina libera, più piccola e quindi dotata di maggiore coefficiente di diffusione, compete sensibilmente con gli ingombranti assemblati poliavidinici. La massima amplificazione di segnale rispetto ad avidina monomericata ottenuta in questo tipo analisi, circa 40-50 volte, (figura 49) si ottiene quando tutta l'avidina in soluzione è presente in forma assemblata.

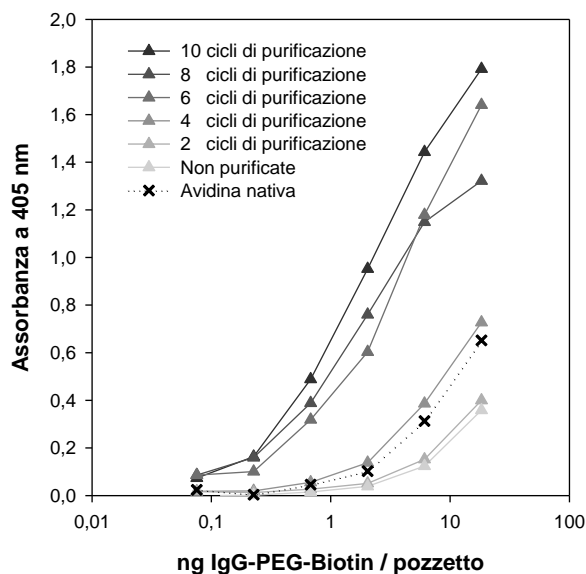


Figura 48. Segnale sviluppato in un saggio ELISA variando la quantità di analita adsorbito su una piastra a 96 pozzetti. La detection è stata effettuata usando assemblati avidina-DNA stabilizzati non purificati (grigio chiaro), parzialmente o completamente purificati (linee da grigio a nero). Il controllo (linea tratteggiata) è stato ottenuto con avidina nativa.

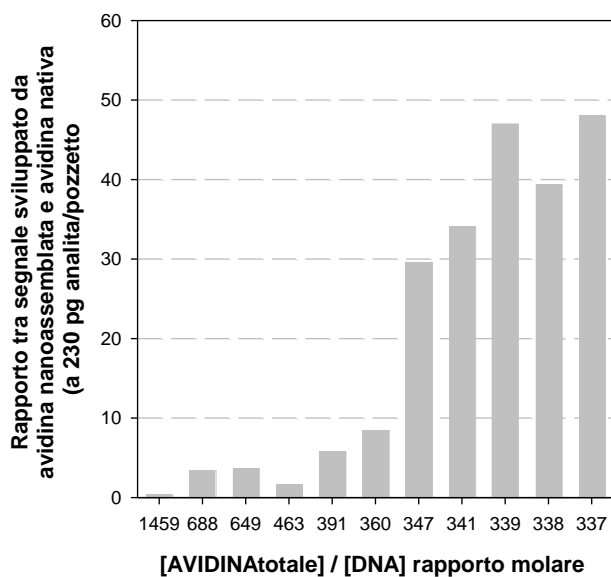


Figura 49. Rapporto tra segnale sviluppato da nanoassemblati stabilizzati e avidina libera in saggio ELISA al variare del grado di purificazione espresso come rapporto molare tra avidina totale su DNA. Il saggio è stato effettuato ad una concentrazione di analita pari a 230 pg/pozzetto.

5.3.2.c. Effetto della conservazione

Per valutare la stabilità dei nanoassemblati sono stati monitorati nel tempo sia la loro dimensione mediante analisi DLS, sia la loro performance di amplificazione in test

ELISA. Le particelle sono state conservate a 4°C in soluzione tampone PBS e analizzate rispettivamente dopo 1, 5, 20 e 50 giorni. Il diametro medio delle particelle (figura 50) non è variato significativamente nell'intervallo finora testato. Non si nota un aumento di dimensione delle particelle e nemmeno un aumento della loro polidispersività. Da un punto di vista dimensionale quindi queste preparazioni risultano stabili. I test di efficacia in saggio ELISA (figura 51) inoltre dimostrano come il comportamento delle particelle non sia influenzato dall'invecchiamento dei preparati e i risultati sempre nettamente superiore alla performance di avidina monomerica. I dati riportati si riferiscono alla preparazione a più bassa quantità di PEG tra quelle testate la quale dovrebbe essere presumibilmente la più sensibile a processi di aggregazione/degradazione in soluzione. Le particelle quindi si possono definire stabili in soluzione sia da un punto di vista dimensionale che funzionale per almeno 50 giorni.

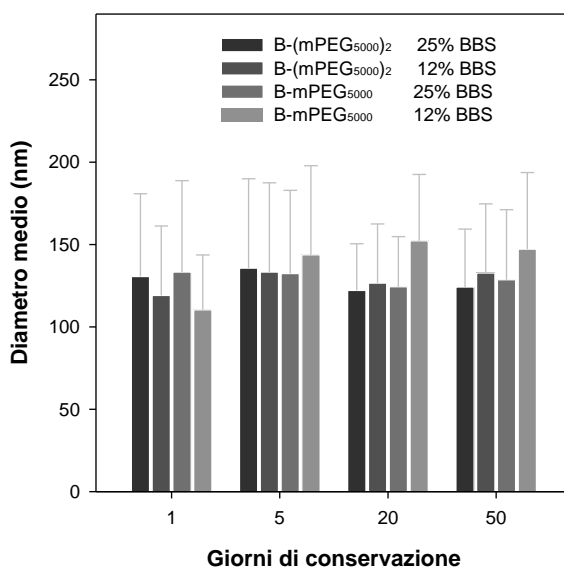


Figura 50. Diametro medio (intensity weighted gaussian analysis) di nanoassemblati purificati rivestiti con differenti tipi e quantità di biotina-mPEG dopo 1, 5, 20 e 50 giorni di conservazione a 4°C. Sono state testate 4 formulazioni di nanoassemblati rivestiti con biotina-mPEG₅₀₀₀ o con biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂ saturando il 12% o il 25% dei siti per la biotina totali (BBS).

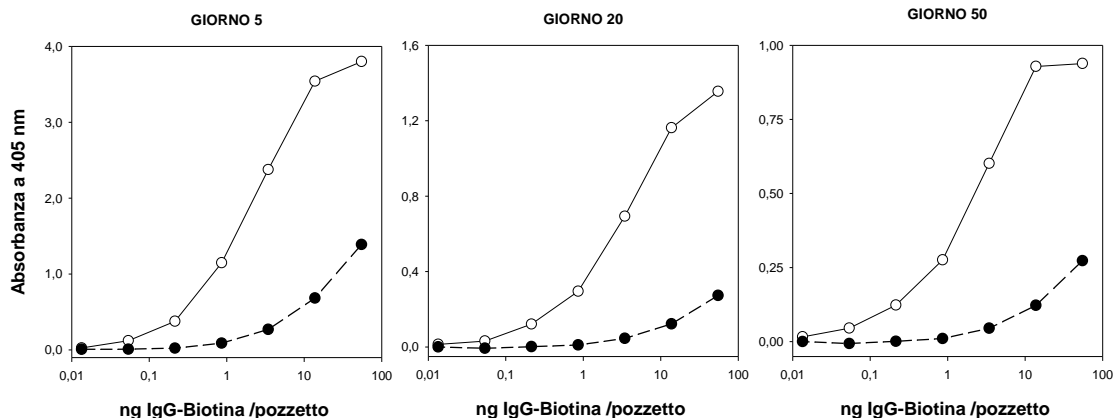


Figura 51. Segnale sviluppato in saggio ELISA al variare della quantità di analita adsorbito su una micropiastra a 96 pozzetti. Detection effettuata con nanoassemblati avidina-DNA dopo 1,5,20 e 50 giorni di conservazione a 4°C. In questo esperimento è stata utilizzata la formulazione di nanoassemblati a minor contenuto in PEG in cui il 12% dei siti per la biotina total i sono stati saturati conbiotina-mPEG₅₀₀₀ .

5.3.3 Biodistribuzione dei nanoassemblati stabilizzati

5.3.3.a. Imaging ottico nel vicino infrarosso

L'imaging ottico nel vicino infrarosso (NIR) è una tecnica semplice e potente che trova crescente utilizzo nell'osservazione di eventi biologici. Viene sfruttata la "finestra di assorbanza" che esiste nella zona spettrale del vicino infrarosso (650-900 nm) in cui l'assorbimento della luce dovuto ai cromofori tissutali (come melanina, ossiemoglobina, deossiemoglobina e acqua) risulta minimo (Papagiannaros, Kale et al. 2009). A queste lunghezze d'onda la luce può penetrare per alcuni centimetri attraverso i tessuti. Utilizzando opportune sonde fluorescenti è quindi possibile ottenere immagini dell'intero corpo di piccoli animali con una miglior definizione e un maggior rapporto segnale-rumore rispetto ad altre zone spettrali che permettono invece solo un imaging di superficie. Il NIR non richiede né la complessa strumentazione di altre tecniche come la tomografia a emissione di positroni (PET) o la risonanza magnetica nucleare (MRI) né l'utilizzo di materiale radioattivo e per questo sta guadagnando attenzione per la visualizzazione di tumori e cellule in vivo (Wolf, Ferrari et al. 2007). Ciò permette di effettuare studi di biodistribuzione in maniera più sicura e meno costosa rispetto a metodiche che prevedono l'utilizzo di radiotraccianti. Ad oggi il principale limite di questa tecnica risiede nella difficoltosa analisi quantitativa del segnale dovuta principalmente a fenomeni di scattering che interferiscono con la misura.

5.3.3.b. Stabilità in plasma di nanoassemblati marcati con biotina-Alexa⁶⁸⁰

La marcatura dei nanoassemblati è stata ottenuta mediante i siti di legame per la biotina utilizzando un derivato biotinilato del fluoroforo commerciale Alexa⁶⁸⁰ appositamente sintetizzato.

Prima di procedere agli studi di biodistribuzione su modelli animali vivi è stato necessario verificare la stabilità dei nanoassemblati marcati in plasma, ambiente in cui attività enzimatiche, come la biotinidasi (Bogusiewicz, Mock et al. 2004), potrebbero portare rapidamente ad una rottura del legame fluoroforo-particella. Nanoassemblati marcati sono stati diluiti in plasma murino o bovino e incubati a 37°C per una settimana. In questo intervallo di tempo è stata monitorata, mediante misure di fluorescenza, la quantità di fluoroforo libero non legato alle particelle. In figura 52 è riportata in funzione del tempo la percentuale di fluoroforo libero. La maggior parte del fluoroforo risulta legato alle particelle anche dopo una settimana di incubazione sia in siero bovino che murino. La percentuale di Alexa⁶⁸⁰ libero infatti non raggiunge il 20% dopo 7 giorni ed è inferiore al 5% nelle prime 24 ore.

Questo approccio di marcatura quindi permette di ottenere nanoassemblati fluorescenti nel vicino infrarosso che possono essere utilizzati per studi di biodistribuzione mediante imaging ottico in fluorescenza.

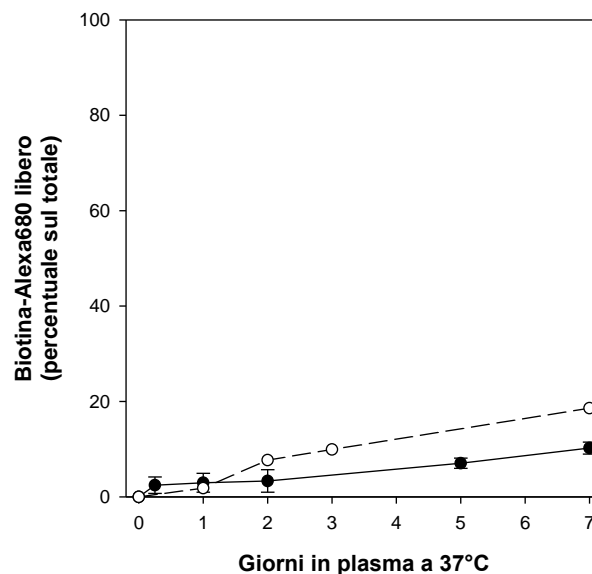


Figura 52. Stabilità in plasma a 37°C di nanoassemblati avidina-DNA stabilizzati marcati con biotina-Alexa⁶⁸⁰. La curva piena si riferisce a campioni incubati in plasma bovino mentre la curva tratteggiata è stata ottenuta con campioni incubati in plasma murino.

5.3.3.c. Imaging ottico di nanoassemblati marcati con biotina-Alexa⁶⁸⁰

Per le prove di biodistribuzione si è utilizzata una formulazione di nanoassemblati stabilizzati in cui il 50% e il 25% dei BBS sono stati saturati rispettivamente con biotina-Alexa⁶⁸⁰ e biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂. Come confronto si è andata a visualizzare inoltre la biodistribuzione delle le seguenti soluzioni

- biotina-Alexa⁶⁸⁰;
- avidina + biotina- Alexa⁶⁸⁰ (50% dei BBS);
- avidina + biotina- Alexa⁶⁸⁰ (50% dei BBS) + biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂ (25% dei BBS).

I campioni sono stati quindi trasferiti al gruppo del prof. Rosato (Istituto Oncologico Veneto) per gli studi *in vivo*. Le soluzioni sono state iniettate a livello della vena caudale in topo balb-c. Prima dell'inoculo, dopo l'inoculo e a tempi prestabiliti (0, 2, 6, 24 e 48 ore) gli animali sono stati anestetizzati e sono state acquisite immagini in fluorescenza dell'animale intero.

Dall'osservazione delle immagini in figura 53 risulta chiaramente visibile che il fluoroforo biotinilato (biotina-Alexa⁶⁸⁰; 1,4 KDa) possiede una emivita molto breve e viene eliminato con le urine nel giro di alcuni minuti. Il segnale relativo all'avidina (avidina + biotina-Alexa⁶⁸⁰; 67 KDa) scompare dopo 24 ore e ciò sembra in accordo con studi di biodistribuzione presenti in letteratura (Schechter, Silberman et al. 1990; Caliceti, Chinol et al. 2002). Sia avidina PEG-ilata (avidina + biotina-Alexa⁶⁸⁰ + biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂; 77 KDa) che le nanoparticelle avidina-DNA (nanoassemblati + biotina-Alexa⁶⁸⁰ + biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂; 25 Mda) possiedono una emivita maggiore, infatti risulta ben visibile il segnale fluorescente dopo 24 ore dall'inoculo. Entrambe producono un segnale fluorescente distribuito in maniera molto diffusa nell'animale mostrano un accumulo a livello epatico. Sembra escluso il tessuto polmonare negli animali trattati con nanoassemblati.

Somministrazioni successive effettuate a due settimane di distanza dalla prima hanno mostrato lo stesso profilo di biodistributivo. Nei topi trattati non è stato evidenziato alcun disturbo correlato alla somministrazione dei campioni.

Dopo aver verificato mediante queste prime indagini *in vivo* che i nanoassemblati in questione sono in grado di circolare nel torrente sanguigno e mostrano una biodistribuzione simile a quella di avidina PEG-ilata, si intende, nel prossimo futuro, andarne a testare su topi malati la reale efficacia di questi nanovettori sfruttando direzionamento attivo e passivo.

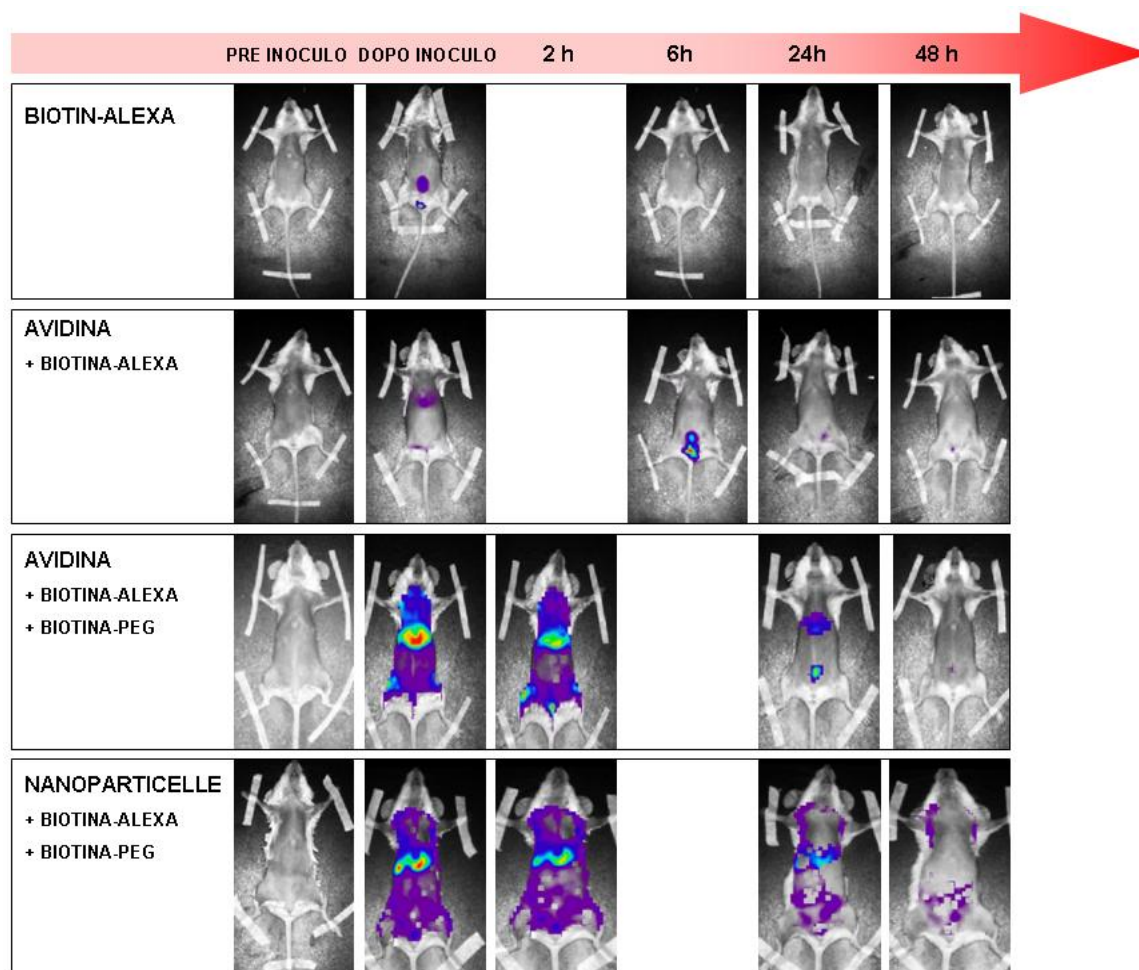


Figura 53. Immagini di fluorescenza in vivo acquisite nel tempo a intervalli prestabiliti (0, 2, 6, 24 e 48 ore) dopo iniezione endovenosa di (dall'alto verso il basso): biotina-Alexa⁶⁸⁰, avidina + biotina-Alexa⁶⁸⁰, avidina + biotina-Alexa⁶⁸⁰ + biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂ e nanoparticelle + biotina-Alexa⁶⁸⁰ + biotina-(mPEG₅₀₀₀)₂.

6. CONCLUSIONI

I risultati di questa tesi hanno fornito numerose informazioni sia sulle basi molecolari dell'interazione tra acidi nucleici e avidina sia sulle effettive potenzialità in ambito applicativo dei nanoassemblati che originano secondariamente a suddetta interazione. Dall'insieme degli esperimenti condotti emergono le seguenti conclusioni:

1) Studio dell'interazione avidina-DNA

- **L'avidina è in grado di legare sia filamenti di DNA a singolo che a doppio filamento.** Nel caso del DNA a singolo filamento, a parità di sequenza **l'interazione con gli esadecameri è più efficiente che non con gli ottameri.** Diversamente dai primi, questi ultimi si legano con avidina con un doppia interazione, la prima caratterizzata da una affinità simile a quella dell'analogo esadecamero (10^{-7} - 10^{-8} M), la seconda di un ordine di grandezza meno efficiente. Probabilmente, in entrambi i casi si uniscono all'avidina 16 basi di DNA, ma la discontinuità che si genera nell'interagire con 2 oligomeri anziché con uno solo rende meno efficiente il guadagno energetico.
- **Il DNA a doppio filamento si unisce alla proteina con una affinità maggiore di quella dei singoli filamenti,** con **costante** nell'ordine **nanomolare.** Questo dato è stato ottenuto attraverso tecniche diverse fra loro, una delle quali ha consentito di individuare anche la **dimensione del sito di legame che è di circa 22,5 paia di basi.** E' emerso inoltre che **a regimi di concentrazione superiori** alla costante di dissociazione nanomolare, il DNA a doppio filamento **è in grado di accomodare ulteriori molecole di avidina e cioè una ogni 13 paia di basi.** Verosimilmente una prima porzione di avidina si lega ad alta affinità ogni 22,5 paia di basi e la seconda si inserisce, con minore affinità, lungo il filamento di acido nucleico nel rimanente spazio a disposizione.
- **L'interazione avviene sia che l'avidina sia in forma libera che legata alla biotina.** In quest'ultima situazione, però, non è possibile utilizzare la tecnica di fluorescenza per effettuare studi di affinità. I dati quantitativi qui ottenuti fanno riferimento solo all'avidina in forma apo (senza biotina). Data l'impossibilità ad

utilizzare la microcalorimetria per via di problemi di aggregazione, la via più semplice per effettuare le indagini con l'avidina biotinilata è probabilmente quella che sfrutta la *Surface Plasmon Resonance* (Biacore). Questi esperimenti sono previsti nel prossimo futuro.

- Per quanto riguarda l'identificazione di potenziali **specificità** per determinare sequenze, **i risultati ad oggi non sono sufficienti per fornire una indicazione precisa**: i dati di fluorescenza suggeriscono **un legame preferenziale** per le sequenze contenenti **citosina e guanina**, ma ciò **riguarda solo i filamenti a singola catena** dove l'interazione sembra dipendere in larga misura dalla possibilità delle basi di interagire con la superficie proteica. Nel caso del DNA a doppio filamento le basi sono impegnate nella reciproca interazione, e i dati di fluorescenza suggeriscono che esse si posizionino più distante dalla superficie proteica. E' possibile che **nel caso della conformazione a doppio filamento diventi più rilevante l'effetto dei fosfati** ed il loro ottimale posizionamento sulla superficie proteica per una interazione efficace. La conferma di questa ipotesi non potrà che arrivare da studi strutturali che si intende intraprendere in collaborazione con altri gruppi di ricerca. Per quanto invece riguarda l'identificazione di potenziali sequenze specifiche, la metodica più indicata per ottenere informazioni sarà probabilmente il DNA *footprinting*.
- I risultati ottenuti sembrano confermare l'ipotesi in cui il **ruolo di avidina in natura sia quello di un potente antimicrobico** non solo attraverso il sequestro della vitamina H (biotina), ma anche mediante la rimozione di acidi nucleici di microrganismi indesiderati. Ciò a meno che non venga isolata una sequenza caratterizzata da affinità maggiori, che possa giustificare un'azione della proteina anche a livello genomico.
- **I derivati PEGilati di avidina sono in grado di interagire con il DNA**, tuttavia solo quando il polimero è legato alla proteina sfruttando i siti di legame per la biotina, l'affinità per il DNA è totalmente preservata. Al contrario, quando il PEG è covalentemente legato ad avidina, l'affinità del coniugato per il DNA diminuisce. Questa diminuzione ha un andamento direttamente correlato alla quantità di polimero e può influenzare negativamente la stabilità in soluzione dei nanoassemblati avidina-DNA e quindi la loro applicabilità. Al contrario la

PEGilazione ottenuta **attravers i siti di legame per la biotina sembra ottimale per la preparazione di nanoassemblati** stabili in soluzione.

2) Ottimizzazione della preparazione dei nanoassemblati avidina-DNA

- **Per l'ottimale utilizzo dei nanoassemblati** avidina-DNA come amplificatori molecolari **in saggi di tipo analitico è indispensabile la completa rimozione dell'avidina libera** non complessata con l'acido nucleico. Il **processo di purificazione tuttavia induce effetti di aggregazione, rilassamento e rottura dei nanoassemblati** non permettendo di fatto una accurata valutazione della loro performance analitica. Nessuna delle tecniche di purificazione testate ha permesso di ottenere una purificazione completa senza produrre una alterazione irreversibile nella struttura dei nanoassemblati. Per questi motivi si è rivelato **indispensabile mettere a punto un processo di stabilizzazione del complesso avidina-DNA.**
- **La stabilizzazione delle nanoparticelle**, pur preservando la loro capacità di interagire con substrati biotinilati, **le ha rese meno suscettibili a fenomeni di degradazione e aggregazione** indotti dalla concentrazione, dall'agitazione e dal mescolamento e, quindi, più facilmente maneggiabili. I **nanoassemblati stabilizzati** si sono dimostrati facilmente purificabili rispetto a quelli non stabilizzati.

3) Applicazione dei nanoassemblati come amplificatori molecolari *in vitro*

- **In saggi immunodiagnostici** modello (ELISA, *dot blot* fluorescente e *dot blot* a rivelazione enzimatica) **i nanoassemblati hanno un performance analitica superiore rispetto ad avidina** in forma non assemblata. La massima amplificazione di segnale prodotta (50X) permette la rivelazione di analiti biotinilati a concentrazioni inferiori di quelle rilevabili utilizzando avidina monomeric. Ciò si riflette in un aumento della sensibilità di due ordini di grandezza.
- **L'efficacia analitica** risulta **influenzata dalla quantità di PEG** utilizzato per il coating superficiale. La miglior performance infatti si ottiene riducendo la quantità e la dimensione di polimero

- Formulazioni di nanoassemblati, **conservati in soluzione a 4°C, sono stabili sia da un punto di vista dimensionale che funzionale**. Il loro diametro come anche la loro capacità di amplificazione in saggi ELISA non subiscono alterazioni in seguito a conservazione a 4°C per almeno 50 giorni.
- I risultati ottenuti hanno permesso di ricavare preziosi parametri formulativi indispensabili per l'ottenimento di nanoassemblati stabili in soluzione, più efficaci di avidina nella rivelazione di analiti presenti a bassa concentrazione. Le prospettive future in quest'ambito riguardano **l'applicazione dei nanoassemblati in analisi diagnostiche *in vitro* di rilevanza clinica**.

4) Nanoassemblati *in vivo*

- **La marcatura dei nanoassemblati** avidina-DNA con il fluoroforo biotinilato appositamente sintetizzato (biotina-Alexa⁶⁸⁰) **è risultata stabile in plasma**.
- **I primi studi di biodistribuzione *in vivo*** effettuati su topi balb-c mediante imaging ottico di fluorescenza nel vicino infrarosso **hanno mostrato una distribuzione diffusa del segnale** nel corpo degli animali trattati con i nanoassemblati. Emerge un accumulo a livello epatico, forse legato alla dose massiccia necessaria per la visualizzazione in fluorescenza, mentre sembra escluso il tessuto polmonare. Iniezioni successive, effettuate a distanza di 15 giorni, non hanno evidenziato apprezzabili differenze nel profilo biodistributivo.
- Studi di *pre targeting* a due step dovranno essere effettuati su animali sani per verificare se, così come avviene *in vitro*, anche *in vivo* i nanoassemblati rappresentano un miglioramento rispetto ad avidina monomerica in termini di amplificazione del segnale.
- Andranno quindi valutate le **potenzialità di questi sistemi come nanovettori per direzionamento al tessuto tumorale** sia passivo (per effetto EPR) che attivo utilizzando particelle funzionalizzate con specifici agenti direzionanti.

7. BIBLIOGRAFIA

- Allen, T. M., I. Ahmad, et al. (1995). "Immunoliposome-mediated targeting of anti-cancer drugs in vivo." Biochem Soc Trans **23**(4): 1073-9.
- Ashorn, R. G., J. Eskola, et al. (1986). "Effect of the progesterone-inducible proteins human lactoferrin and chicken avidin on lymphocyte proliferation." Hum Reprod **1**(3): 149-51.
- Board, R. G. and R. Fuller (1974). "Non-specific antimicrobial defences of the avian egg, embryo and neonate." Biol Rev Camb Philos Soc **49**(1): 15-49.
- Bogusiewicz, A., N. I. Mock, et al. (2004). "Instability of the biotin-protein bond in human plasma." Anal Biochem **327**(2): 156-61.
- Brannon-Peppas, L. and J. O. Blanchette (2004). "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy." Adv Drug Deliv Rev **56**(11): 1649-59.
- Bubb, M. O., F. Green, et al. (1993). "Natural Antibodies to Avidin in Human Serum." Immunology Letters **35**(3): 277-280.
- Cabral, D. A., B. A. Loh, et al. (1987). "Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages." Pediatr Res **22**(4): 429-31.
- Caliceti, P., M. Chinol, et al. (2002). "Poly(ethylene glycol)-avidin bioconjugates: suitable candidates for tumor pretargeting." J Control Release **83**(1): 97-108.
- Caliceti, P., M. Chinol, et al. (2002). "Poly(ethylene glycol)-avidin bioconjugates: suitable candidates for tumor pretargeting." Journal of Controlled Release **83**(1): 97-108.
- Connors, R., E. Hooley, et al. (2006). "Recognition of oxidatively modified bases within the biotin-binding site of avidin." J Mol Biol **357**(1): 263-74.
- Dams, E. T., P. Laverman, et al. (2000). "Accelerated blood clearance and altered biodistribution of repeated injections of sterically stabilized liposomes." J Pharmacol Exp Ther **292**(3): 1071-9.
- Decuzzi, P., F. Causa, et al. (2006). "The effective dispersion of nanovectors within the tumor microvasculature." Ann Biomed Eng **34**(4): 633-41.
- DeLange, R. J. and T. S. Huang (1971). "Egg white avidin. 3. Sequence of the 78-residue middle cyanogen bromide peptide. Complete amino acid sequence of the protein subunit." J Biol Chem **246**(3): 698-709.
- Dickson, E. F., A. Pollak, et al. (1995). "Time-resolved detection of lanthanide luminescence for ultrasensitive bioanalytical assays." J Photochem Photobiol B **27**(1): 3-19.
- Dubertret, B., P. Skourides, et al. (2002). "In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles." Science **298**(5599): 1759-62.
- Elo, H. A., S. Raisanen, et al. (1980). "Induction of an antimicrobial biotin-binding egg white protein (avidin) in chick tissues in septic *Escherichia coli* infection." Experientia **36**(3): 312-3.
- Gao, X., Y. Cui, et al. (2004). "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots." Nat Biotechnol **22**(8): 969-76.
- Gbadamosi, J. K., A. C. Hunter, et al. (2002). "PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance." FEBS Lett **532**(3): 338-44.
- Gitlin, G., E. A. Bayer, et al. (1987). "Studies on the biotin-binding site of avidin. Lysine residues involved in the active site." Biochem J **242**(3): 923-6.

- Gitlin, G., E. A. Bayer, et al. (1988). "Studies on the biotin-binding site of avidin. Tryptophan residues involved in the active site." Biochem J **250**(1): 291-4.
- Goldenberg, D. M. and R. M. Sharkey (2006). "Advances in cancer therapy with radiolabeled monoclonal antibodies." Q J Nucl Med Mol Imaging **50**(4): 248-64.
- Goldenberg, D. M., R. M. Sharkey, et al. (2006). "Antibody pretargeting advances cancer radioimmunodetection and radioimmunotherapy." J Clin Oncol **24**(5): 823-34.
- Green, N. M. (1963). "Avidin. 3. the Nature of the Biotin-Binding Site." Biochem J **89**: 599-609.
- Green, N. M. (1964). "Avidin. 5. Quenching of fluorescence by dinitrophenyl groups." Biochem J **90**(3): 564-8.
- Green, N. M. (1965). "A Spectrophotometric Assay for Avidin and Biotin Based on Binding of Dyes by Avidin." Biochem J **94**: 23C-24C.
- Green, N. M. (1975). "Avidin." Adv Protein Chem **29**: 85-133.
- Habeeb, A. F. (1966). "Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid." Anal Biochem **14**(3): 328-36.
- Harding, J. A., C. M. Engbers, et al. (1997). "Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes." Biochim Biophys Acta **1327**(2): 181-92.
- Harisinghani, M. G., J. Barentsz, et al. (2003). "Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer." N Engl J Med **348**(25): 2491-9.
- Helppolainen, S. H., K. P. Nurminen, et al. (2007). "Rhizavidin from *Rhizobium etli*: the first natural dimer in the avidin protein family." Biochem J **405**(3): 397-405.
- Hytonen, V. P., J. A. Maatta, et al. (2007). "Structure and characterization of a novel chicken biotin-binding protein A (BBP-A)." BMC Struct Biol **7**: 8.
- Hytonen, V. P., J. A. Maatta, et al. (2005). "Design and construction of highly stable, protease-resistant chimeric avidins." J Biol Chem **280**(11): 10228-33.
- Illum, L., L. O. Jacobsen, et al. (1987). "Surface characteristics and the interaction of colloidal particles with mouse peritoneal macrophages." Biomaterials **8**(2): 113-7.
- Keinanen, R. A., M. L. Laukkanen, et al. (1988). "Molecular cloning of three structurally related genes for chicken avidin." J Steroid Biochem **30**(1-6): 17-21.
- Keinanen, R. A., M. J. Wallen, et al. (1994). "Molecular cloning and nucleotide sequence of chicken avidin-related genes 1-5." Eur J Biochem **220**(2): 615-21.
- Koivunen, E., W. Arap, et al. (1999). "Identification of receptor ligands with phage display peptide libraries." J Nucl Med **40**(5): 883-8.
- Koopmann, J. O., M. Post, et al. (1996). "Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP)." Eur J Immunol **26**(8): 1720-8.
- Laitinen, O. H., V. P. Hytonen, et al. (2002). "Chicken avidin-related proteins show altered biotin-binding and physico-chemical properties as compared with avidin." Biochem J **363**(Pt 3): 609-17.
- Li-Chan E.C.Y., P. W. D. a. N. S., Ed. (1995). Chemistry of eggs and egg products. . In Egg Science and Technology.
- Loew, R. C. a. K. (1903). "Ueber a-Methyl-Indol." Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft **36**: 4326-4330.
- Marras, S. A., S. Tyagi, et al. (2006). "Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes." Clin Chim Acta **363**(1-2): 48-60.
- Moghimi, S. M. and A. C. Hunter (2001). "Capture of stealth nanoparticles by the body's defences." Crit Rev Ther Drug Carrier Syst **18**(6): 527-50.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2001). "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice." Pharmacol Rev **53**(2): 283-318.

- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2001b). "Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice." *Pharmacol Rev* **53**(2): 283-318.
- Moghimi, S. M., A. C. Hunter, et al. (2005). "Nanomedicine: current status and future prospects." *Faseb J* **19**(3): 311-30.
- Morpurgo, M., A. Radu, et al. (2004). "DNA condensation by high-affinity interaction with avidin." *J Mol Recognit* **17**(6): 558-66.
- Morpurgo M., P. M., Teoli D, (2009). NANOASSEMBLED COMPLEXES OF NUCLEIC ACIDS, AVIDIN AND POLYMERS, USE AND PREPARATION THEREOF. U. D. S. D. PADOVA.
- Nardone, E., C. Rosano, et al. (1998). "Biochemical characterization and crystal structure of a recombinant hen avidin and its acidic mutant expressed in *Escherichia coli*." *Eur J Biochem* **256**(2): 453-60.
- Nordlund, H. R., V. P. Hytonen, et al. (2005). "Tetravalent single-chain avidin: from subunits to protein domains via circularly permuted avidins." *Biochem J* **392**(Pt 3): 485-91.
- Paganelli, G., P. Magnani, et al. (1991). "Three-step monoclonal antibody tumor targeting in carcinoembryonic antigen-positive patients." *Cancer Res* **51**(21): 5960-6.
- Papagiannaros, A., A. Kale, et al. (2009). "Near infrared planar tumor imaging and quantification using nanosized Alexa 750-labeled phospholipid micelles." *Int J Nanomedicine* **4**: 123-31.
- Pasqualini, R. and E. Ruoslahti (1996). "Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries." *Nature* **380**(6572): 364-6.
- Pasqualini, R. and E. Ruoslahti (1996). "Tissue targeting with phage peptide libraries." *Mol Psychiatry* **1**(6): 423.
- Perez, J. M., L. Josephson, et al. (2004). "Use of magnetic nanoparticles as nanosensors to probe for molecular interactions." *ChemBiochem* **5**(3): 261-4.
- Praetorius, N. P. and T. K. Mandal (2007). "Engineered nanoparticles in cancer therapy." *Recent Pat Drug Deliv Formul* **1**(1): 37-51.
- Pugliese, L., A. Coda, et al. (1993). "Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution." *J Mol Biol* **231**(3): 698-710.
- Pugliese, L., M. Malcovati, et al. (1994). "Crystal structure of apo-avidin from hen egg-white." *J Mol Biol* **235**(1): 42-6.
- Sahoo, S. K. and V. Labhasetwar (2003). "Nanotech approaches to drug delivery and imaging." *Drug Discov Today* **8**(24): 1112-20.
- Schechter, B., R. Silberman, et al. (1990). "Tissue distribution of avidin and streptavidin injected to mice. Effect of avidin carbohydrate, streptavidin truncation and exogenous biotin." *Eur J Biochem* **189**(2): 327-31.
- Struthers, L., R. Patel, et al. (1998). "Direct detection of 8-oxodeoxyguanosine and 8-oxoguanine by avidin and its analogues." *Anal Biochem* **255**(1): 20-31.
- Takakura, Y., M. Tsunashima, et al. (2009). "Tamavidins--novel avidin-like biotin-binding proteins from the Tamogitake mushroom." *Febs J* **276**(5): 1383-97.
- Tuohimaa, P., T. Joensuu, et al. (1989). "Development of progestin-specific response in the chicken oviduct." *Int J Dev Biol* **33**(1): 125-34.
- Tyagi, S. and F. R. Kramer (1996). "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization." *Nat Biotechnol* **14**(3): 303-8.
- Tyler, B. M., K. Jansen, et al. (1999). "Peptide nucleic acids targeted to the neurotensin receptor and administered i.p. cross the blood-brain barrier and specifically reduce gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 7053-8.
- Veronese, F. M. and M. Morpurgo (1999). "Bioconjugation in pharmaceutical chemistry." *Farmaco* **54**(8): 497-516.

- Wallen, M. J., M. O. Laukkanen, et al. (1995). "Cloning and sequencing of the chicken egg-white avidin-encoding gene and its relationship with the avidin-related genes Avr1-Avr5." Gene **161**(2): 205-9.
- Watson, A., X. Wu, et al. (2003). "Lighting up cells with quantum dots." Biotechniques **34**(2): 296-300, 302-3.
- Weber, P. C., M. J. Cox, et al. (1987). "Crystallographic data for Streptomyces avidinii streptavidin." J Biol Chem **262**(26): 12728-9.
- Wilchek, M. and E. A. Bayer (1990). "Introduction to avidin-biotin technology." Methods Enzymol **184**: 5-13.
- Wilchek, M., E. A. Bayer, et al. (2006). "Essentials of biorecognition: the (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction." Immunol Lett **103**(1): 27-32.
- Wolf, M., M. Ferrari, et al. (2007). "Progress of near-infrared spectroscopy and topography for brain and muscle clinical applications." J Biomed Opt **12**(6): 062104.
- Yao, Z., M. Zhang, et al. (1998). "Rapid internalization of avidin after binding to tumor cells." Journal of Nuclear Medicine **39**(5): 224p-224p.