



Università degli Studi di Verona  
Dipartimento di Biotecnologie

**RELAZIONE SCIENTIFICA**

*Assegno di Ricerca (AdR2273/14)*

<i>Nome e Cognome del Beneficiario</i>	Lucia Cenci
<i>Titolo del Programma di Ricerca</i>	Nanotecnologie nello sviluppo di molecole e di sistemi/protocolli innovativi applicati alla diagnostica delle patologie cardiovascolari
<i>Settore Scientifico Disciplinare di riferimento</i>	CHIM/01 - CHIMICA ANALITICA
<i>Nome e Cognome del Responsabile Scientifico</i>	Prof. Alessandra Maria Bossi
<i>Durata dell'Assegno di Ricerca (da...a...)</i>	1 aprile 2014 - 31 marzo 2015
<i>Periodo di riferimento della relazione (da...a...)</i>	1 aprile 2014 - 31 marzo 2015
<i>Note (es.: eventuali periodi di sospensione dell'Assegno, etc.)</i>	



## Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

### **DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA** (*presupposti/obiettivi, metodologie applicate, risultati intermedi raggiunti, discussione*)

#### Presupposti

Il progetto si inserisce all'interno del Verona Nanomedicine Initiative 2011-2014 e si colloca nel gruppo di lavoro WP2 – Diagnostica.

WP2 ha avuto l'obiettivo di sviluppare nuovi metodi di screening genomico e proteomico basati su nanotecnologie e/o nanomateriali nell'ambito della diagnostica di: malattia aterosclerotica coronarica (CAD), infarto miocardico (IM) e ipertensione. La scelta delle patologie è stata dettata dall'importanza delle malattie cardiovascolari, principale causa di mortalità nel mondo e dalla possibilità di accedere alla biobanca del "Verona Heart Study" (VHS), di cui i Prof. Olivieri e Girelli, componenti del gruppo di lavoro WP2, sono responsabili e che comprende più di 2000 soggetti.

La ricerca del WP2 ha riguardato l'uso delle nanotecnologie per migliorare le capacità diagnostiche.

In particolare si è scelto di lavorare con nano particelle polimeriche stampate, basate sulla tecnologia dei Molecularly Imprinted Polymers (MIPs). I vantaggi dei MIPs risiedono nella loro stabilità alla temperatura, nell'economicità della sintesi, nella versatilità di stampo contro qualsivoglia analita di interesse, nelle proprietà di trasferimento di massa veloci, tipico vantaggio conferito dalle nano dimensioni, che permettono cinetiche di legame rapide e pertanto rendono le nano particelle stampate ideali elementi recettoriali in sensori o in dosaggi.

#### Obiettivi della ricerca:

- sintetizzare polimeri MIP in grado di legare peptidi di cTnI
- integrare i MIPs in un metodo di arricchimento selettivo per cTnI con l'obiettivo ultimo di sviluppare kit diagnostici e sensori basati su nanoparticelle polimeriche stampate.

#### Metodologie Applicate:

- Sintesi di MIPs e nanoMIPs.
- Indagini delle caratteristiche chimico-fisiche dei MIPs con Dynamic Light Scattering.
- Indagine delle caratteristiche di legame dei MIPs con Isothermal Titration Calorimetry.
- Indagine della selettività e capacità di binding dei MIPs con esperimenti di legame in HPLC.

#### Risultati e discussione

Nella prima fase del lavoro sono state preparate micro e nanoparticelle polimeriche stampate, dette colloquialmente anticorpi di plastica, tramite tecnologia MIP. Sono stati utilizzati come molecole stampo gli epitopi di cTnI, selezionati mediante il metodo fingerprint precedentemente sviluppato presso il nostro laboratorio. [Bossi et al., 2012]. Secondo tale metodo, tre sono i peptidi (AK9, NR11 e NK11) distintivi della proteina di interesse. Sono state preparate diversi polimeri, caratterizzati da diverse composizioni di monomeri, per ciascuno dei tre epitopi. Dopo la sintesi i polimeri sono stati macinati manualmente fino ad ottenere particelle di dimensioni micrometriche (MIP). Successivamente sono stati fatti dei lavaggi per rimuovere completamente il template e i



## Università degli Studi di Verona Dipartimento di Biotecnologie

monomeri non reagiti. Parallelamente, sono stati sintetizzati anche dei polimeri di controllo non stampati (NIP).

Le particelle sono state caratterizzate sia dal punto di vista fisico (dimensioni, peso molecolare medio) che funzionale (capacità di binding, selettività, affinità). Le dimensioni sono state studiate mediante Dynamic Light Scattering. Come atteso, le particelle hanno mostrato un diametro di 1-2  $\mu\text{m}$  mentre il peso molecolare medio è stato stimato tra i 15 e i 19 MDa.

Le prove di binding, effettuate incubando le particelle (MIP e NIP) con il loro peptide target, hanno permesso di valutare la capacità di binding (circa 2  $\mu\text{g}$  di peptide per mg di polimero) e la specificità di legame (definita come imprinting factor, ovvero  $[\text{peptide-MIP}]/[\text{peptide-NIP}]$ ), quest'ultima superiore a 3 per tutti i lotti. La cinetica di binding è risultata veloce, con tempi di incubazione compatibili con una possibile applicazione diagnostica futura.

La selettività di legame è stata valutata con il peptide target in presenza di un peptide competitore. In seguito si è passati a un sistema più complesso che mima verosimilmente i campioni biologici: il digerito di albumina umana. Anche in questo caso le particelle hanno dimostrato promettenti capacità di arricchimento del peptide target. Infine, l'interazione peptide-MIP è stata caratterizzata dal punto di vista termodinamico mediante Isothermal Titration Calorimetry e, per tutti e tre gli epitopi, ha mostrato ottime costanti di affinità ( $K_d$ ) nell'ordine del nanomolare.

In conclusione, la tecnologia del molecular imprinting può essere efficacemente impiegata nel riconoscimento di cTnI e pertanto il lavoro prosegue con l'integrazione dei MIPs a metodi di diagnosi sensibili, quali dosaggi immunometrici e spettrometria di massa, per sviluppare un sistema diagnostico dell'IM.

### **DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA ALL'ESTERO** *(eventuale)*



Università degli Studi di Verona  
Dipartimento di Biotecnologie

**DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NELL'AMBITO DEL DOTTORATO DI RICERCA** *(eventuale)*

**DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DIDATTICA COLLEGATA** *(eventuale)*

**SEMINARI/CONFERENZE TENUTI**



Università degli Studi di Verona  
Dipartimento di Biotecnologie

**RISULTATI DELLA RICERCA (pubblicazioni, rapporti, brevetti, etc.)**

Poster contributions to international conferences:

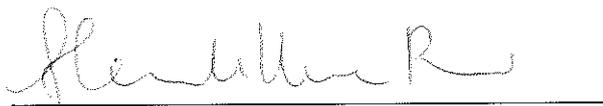
11th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN14), Thessaloniki, Greece, 8-11 July 2014. "A rational method to select epitopes of clinical relevance helps developing nano/materials for proteomics." L. Cenci, P. S. Sharma, R. Levi, A. M. Bossi.

Oral contributions to international conferences:

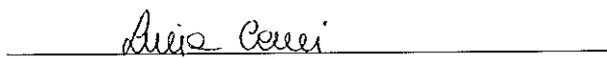
European Iron Club – Meeting Verona 2014, Verona 11-14 September 2014. "Hepcidin-25 assays and sensors based on molecularly imprinted nanoparticles." Bossi A.M., Andreetto E., Cenci L., Castagna A., Girelli D., Olivieri O.

The 8th International Congress on Molecular Imprinting-MIP2014, Jiangsu University, Zhenjiang, 212013, P. R. China, 18-21 September 2014. "Molecularly Imprinted Polymers Matrixes for MALDI-MS." Bossi A.M., Cenci L

*Il Responsabile Scientifico*

  
(Firma)

*L'Assegnista di Ricerca*

  
(Firma)