



BioSensori

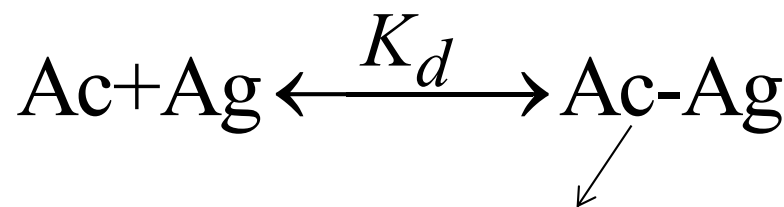
Alessandro Tognetti

Biosensori ad affinità

- Rappresentano la seconda generazione di biosensori per applicazioni biomediche
- Sfruttano la capacità di anticorpi, recettori, acidi nucleici di legarsi in modo specifico alle molecole di interesse
- **I biosensori catalitici** utilizzano bio-recettori in grado di riconoscere molecole e di trasformarle in prodotti attraverso una reazione chimica.
- **I biosensori di affinità** sfruttano la capacità di una molecola di legarsi in modo specifico all'elemento da riconoscere.
- **Immunosensori**
 - Basati su anticorpi (Ac): sfruttano il legame specifico che si crea tra Ac e il relativo Antigene (Ag)
- Biosensori ad **acidi nucleici** (DNA/RNA)
 - sfruttano il legame con sequenze complementari

Immunosensori

- Gli **immunosensori** sono un tipo particolare di biosensori basati sulla capacità tipica degli anticorpi di riconoscere e legare a sé antigeni.
- Gli anticorpi sono proteine globulari che giocano un ruolo fondamentale nel sistema immunologico degli organismi viventi.
- Produzione: tramite tecniche di ibridizzazione e clonazione è attualmente possibile produrre anticorpi monoclonali che riconoscono e sono capaci di legarsi praticamente a qualsiasi tipo di molecola o antigene.
- È quindi possibile realizzare immunosensori per la rivelazione di una vasta gamma di sostanze.
- Gli anticorpi (Ac) reagiscono in maniera reversibile con gli antigeni (Ag) e l'**affinità** fra i due è determinata dalla **costante di dissociazione** K_d .



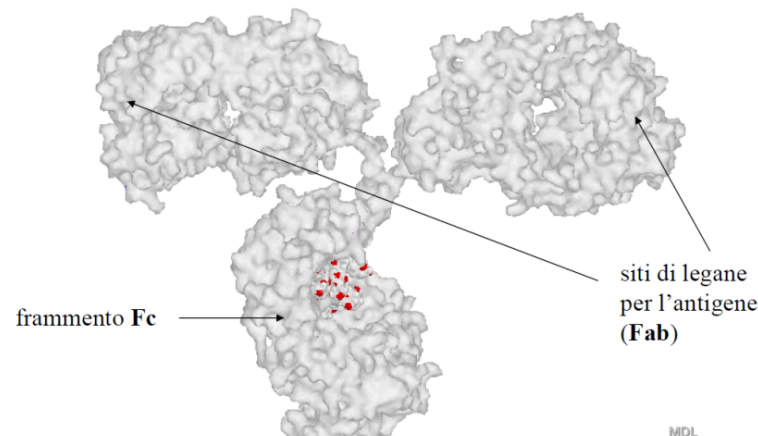
$$K_d = \frac{[Ac][Ag]}{[Ac-Ag]}$$

Legame reversibile di tipo non covalente (interazione debole su una piccola porzione di Ac)

Immunosensori

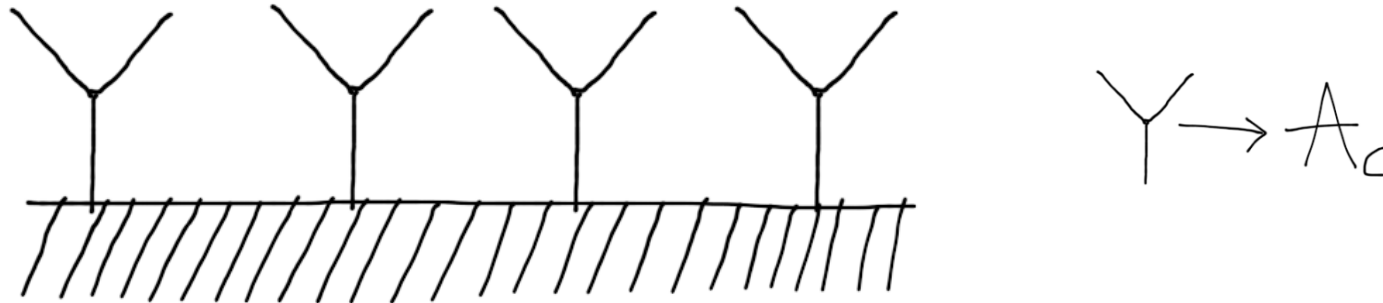
- Kd ha un valore tipicamente compreso tra 10^{-4} e 10^{-12} moli/litro,
- Valori più piccoli indicano una affinità più elevata
 - Maggiore concentrazione di anticorpi legati a parità di concentrazione iniziale (equilibrio della reazione più spostato a destra)
- Nella risposta immunitaria la molecola dell'antigene non è interessata in tutto, bensì solo in piccolissime aree della sua superficie, chiamate siti antigenici o epitopi. Il legame che si instaura tra anticorpo ed antigene è di tipo non covalente. Le forze che agiscono sono forze elettrostatiche, ponti di idrogeno, legami idrofobici e forze di Van der Waals.

Anticorpo: visualizzazione in modalità "surface"

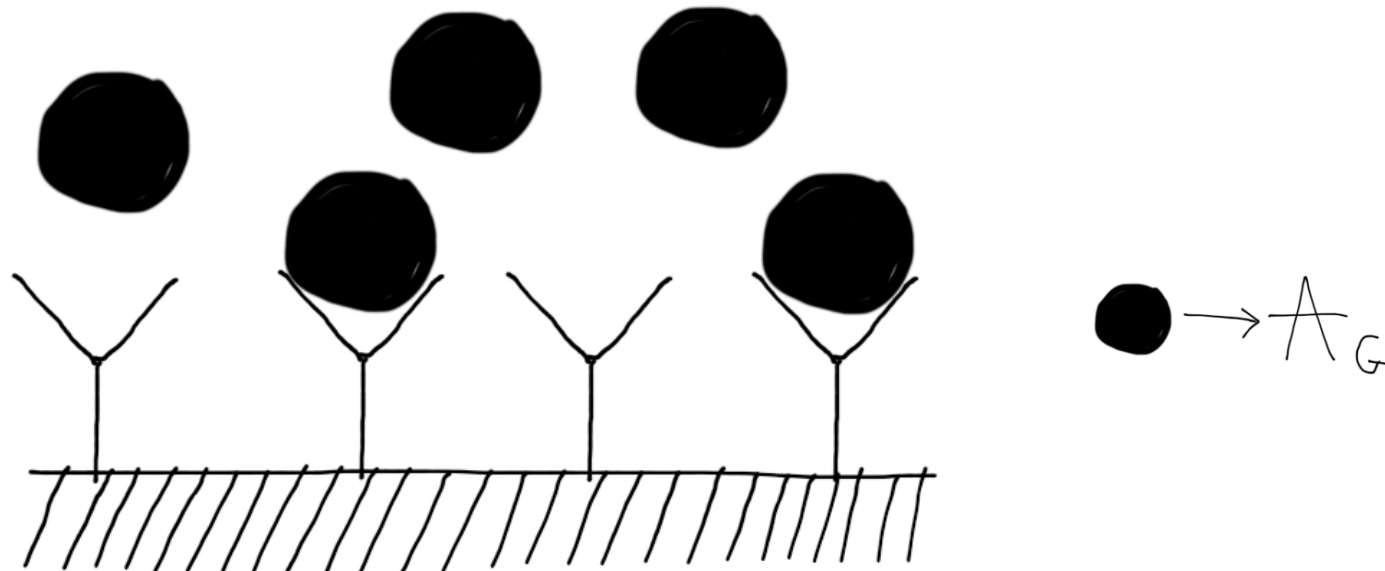


Immunosensori

- Il recettore (ovvero l'anticorpo) viene immobilizzato su un supporto che viene posto in contatto con la soluzione contenente l'analita da misurare



- L'anticorpo reagisce con gli antigeni in soluzione (si creano i siti di legame). Maggiore la concentrazione di Ag più alto sarà il numero di Ac legati.



Immunosensori

- In sintesi (I principi sono analoghi agli altri sensori di affinità)
 - Ag sostanza target (analita)
 - Ac immobilizzato su una superficie e immerso in soluzione
 - Si forma il complesso Ag-Ac sullo strato anticorpale
 - La percentuale di Ac legato è funzione della concentrazione di Ag in soluzione e di Kd

$$p = \frac{N_{Ac-Ag}}{N_{Ac_{tot}}}$$

→ Numero anticorpi legati

→ Numero anticorpi totali

- p viene rilevata con tecniche tradizionali (elettrochimiche, ottiche, sensori fisici)
- Necessità di un modello

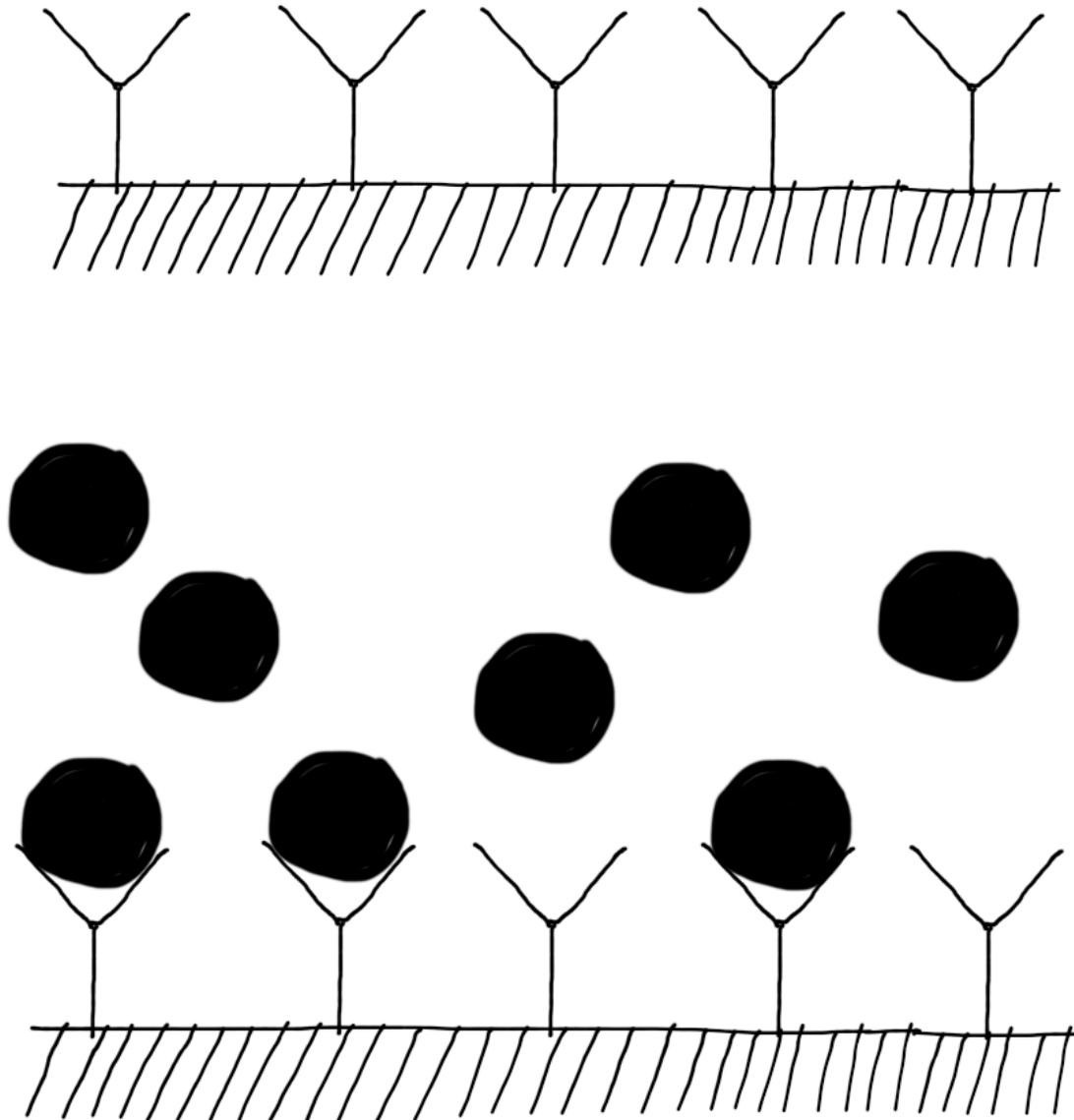
$$[Ag] = f(p)$$

Immunosensori

- La quantità di Ag legati viene misurata con tecniche tradizionali (ottiche, gravimetriche, elettrochimiche) e messa in relazione con la concentrazione di Ag in soluzione
- Come nel caso dei biosensori catalitici, occorre trovare un modello che legghi la quantità di Ag legati (percentuale di Ag-Ac sul totale di Ac iniziali) alla concentrazione dell'analita (Ag) in soluzione
- Classificazione immunosensori
 - Diretti
 - L'evento di riconoscimento e la formazione del legame viene rivelato direttamente. I sensori diretti consistono in un anticorpo immobilizzato su una superficie solida. Il legame fra antigene ed anticorpo provoca un cambiamento in proprietà quali potenziale, capacità o massa, che un trasduttore converte in un segnale misurabile.
 - Indiretti
 - Richiedono un certo numero di passaggi in più rispetto agli altri (tempi di misura più lunghi). Marcatura (**labelling**) di Ag o Ac . Hanno però il vantaggio di sfruttare metodi di trasduzione più vantaggiosi dal punto di vista dell'acquisizione del segnale (Immunosensore competitivo, Immunosensore sandwich)

Configurazione Immunosensori

- Diretto: processo 2 passi

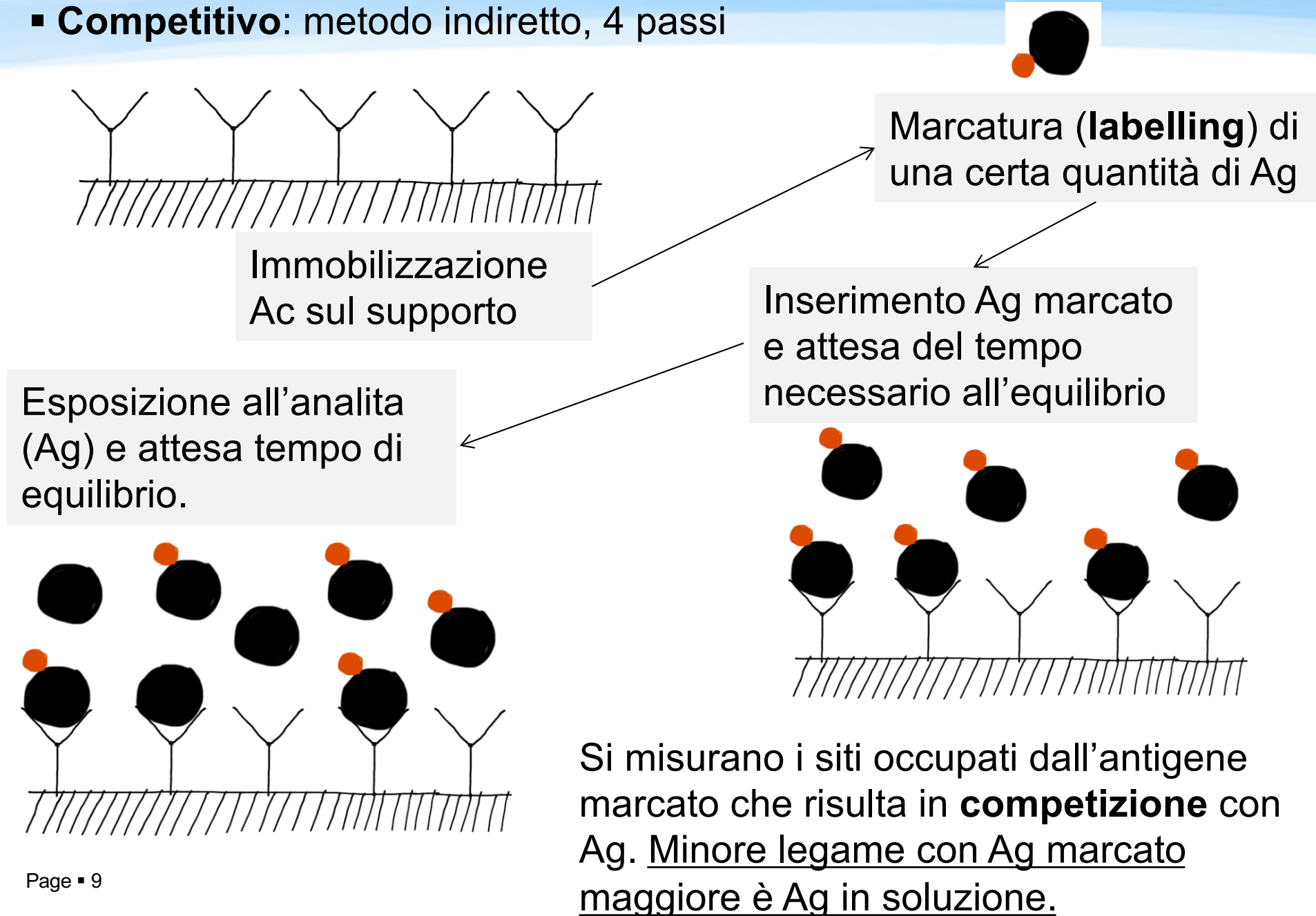


Immobilizzazione
Ac sul supporto

Esposizione all'analita
(Ag) e misura
dell'interazione Ac-Ag
(percentuale di
anticorpi legati)

Configurazione Immunosensori

- **Competitivo:** metodo indiretto, 4 passi

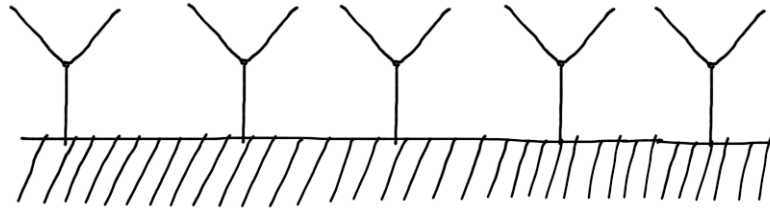
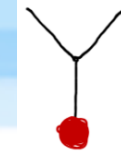


Immunosensore competitivo

- Nella configurazione competitiva l'anticorpo viene immobilizzato su una superficie solida.
- La misura viene effettuata facendo interagire il campione (che contiene l'antigene in concentrazione incognita) con una concentrazione nota di antigene preventivamente marcato tipicamente con una particella fluorescente (fluoroforo).
- L'antigene marcato compete con il campione da analizzare nell'occupazione dei siti anticorpali ed il segnale così ottenuto è inversamente proporzionale alla concentrazione incognita.
- Tipicamente, questa tecnica viene utilizzata in casi in cui l'antigene è troppo piccolo per essere rivelato con metodi diretti.

Configurazione Immunosensori

- **Sandwich:** metodo indiretto, 4 passi

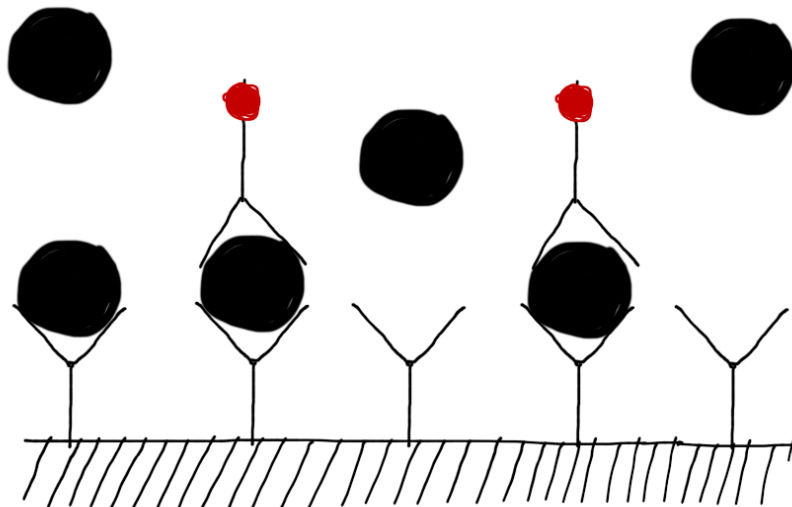
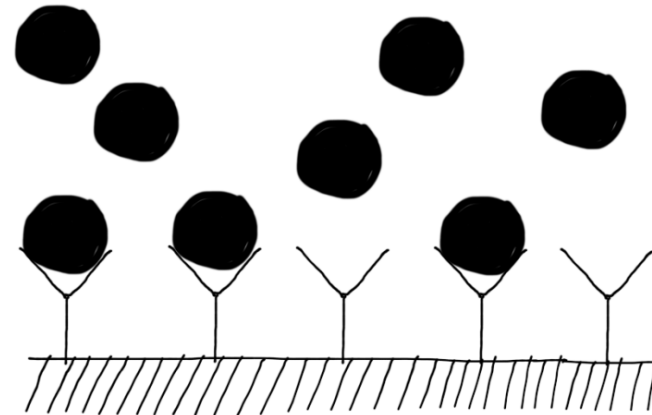


Immobilizzazione
Ac sul supporto

Marcatura (labelling) di
una certa quantità di Ac

Esposizione all'analita
(Ag) e attesa tempo di
equilibrio.

Inserimento Ac marcato
e attesa del tempo
necessario all'equilibrio



Si misurano i siti occupati dall'anticorpo marcato. Maggiore legame con Ac marcato maggiore è Ag in soluzione.

Immunosensore Sandwich

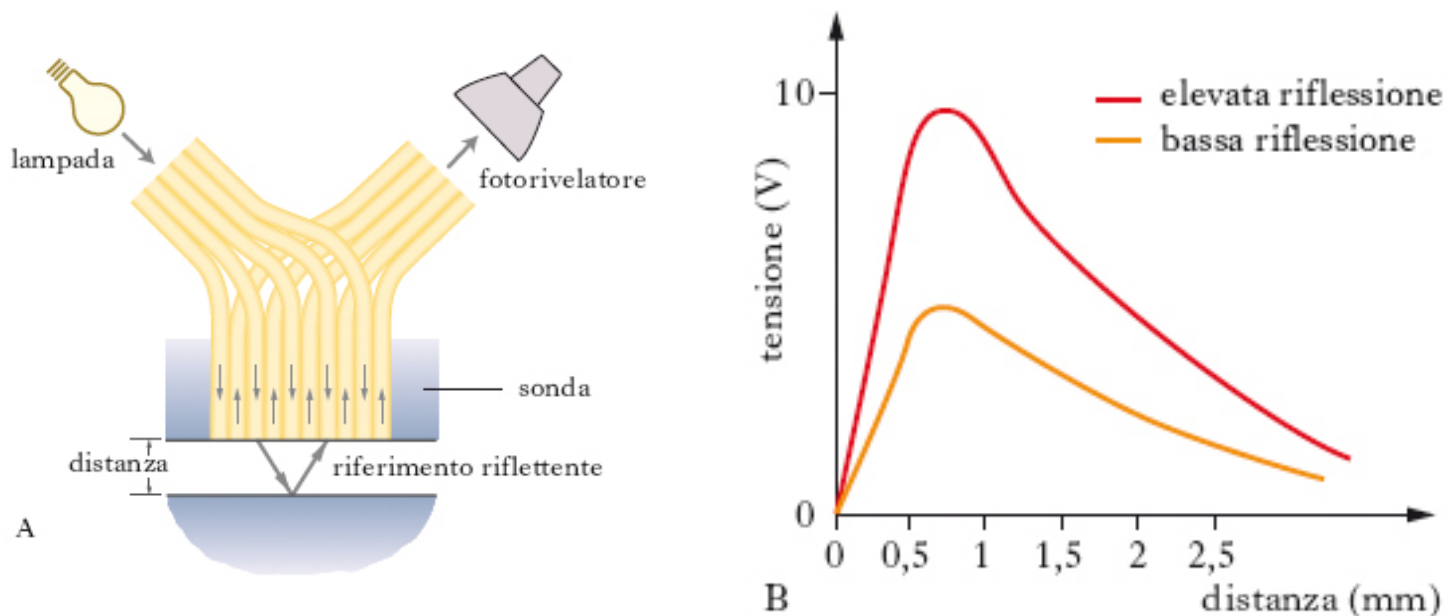
- Nel metodo sandwich una volta che l'antigene ha reagito con l'anticorpo immobilizzato, viene introdotto un secondo anticorpo marcato che si lega con l'antigene già attaccato all'anticorpo sulla superficie, creando appunto una sorta di sandwich di cui l'antigene occupa lo strato centrale.
- Il sistema a sandwich richiede due anticorpi monoclonali in grado di riconoscere due epitopi su due zone diverse del antigene. Quest'ultima configurazione può essere utilizzata solo nei casi in cui l'antigene è grande abbastanza per presentare due epitopi diversi.
- Sono evidenti il maggior numero di operazioni richieste e la necessità della presenza di un operatore (o di una accresciuta complessità nel caso di ingegnerizzazione automatica della procedure).
- In compenso, però, è così possibile analizzare qualsiasi tipo di antigene con sistemi ottici, marcando opportunamente l'anticorpo secondario mentre per sensori gravimetrici, la tecnica a sandwich può aumentare la sensibilità della misura.

Metodi di trasduzione

- La percentuale di Ag legati può essere rivelata con tecniche elettrochimiche, ottiche, elettriche (variazione di resistenza o di capacità), o gravimetriche (variazione di peso).
- Tra i metodi rimanenti quelli più utilizzati sono quelli ottici
 - fluorescenza indotta da un'onda evanescente (TIRF)
 - risonanza di plasmoni superficiali (SPR)

Immunosensori ottici

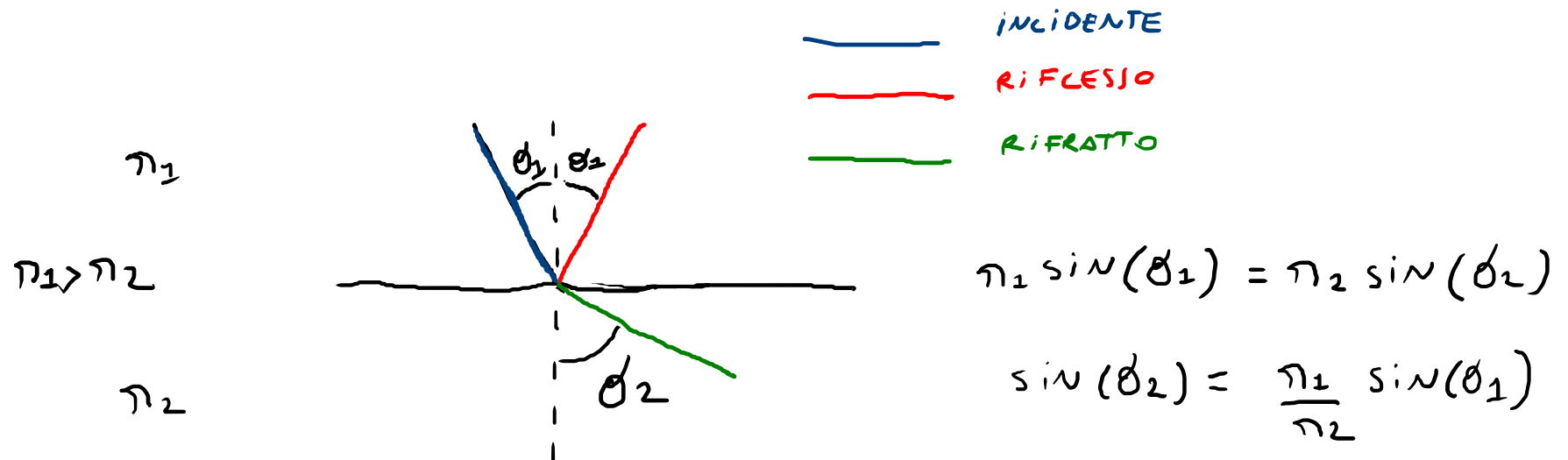
- Gli immunosensori ottici utilizzano una guida d'onda, che viene a contatto con la soluzione contenente l'antigene da analizzare.
- La parte sensibile di tali dispositivi è costituita dalla superficie su cui è immobilizzato l'anticorpo. La formazione del composto antigene-anticorpo provoca una variazione nei parametri ottici che caratterizzano il film anticorpale, tra cui l'indice di rifrazione complesso e lo spessore dello strato.
- Generalmente viene analizzata la luce riflessa dalla superficie sensibile e da tale misura si risale alla variazione delle costanti ottiche.



Immunosensore TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)

- Sfrutta il principio della Riflessione interna totale
 - Si genera tra due mezzi trasparenti aventi indice di rifrazione diverso
 - Avviene all'interfaccia tra un mezzo più denso (indice di rifrazione n_1) e uno meno denso (indice di rifrazione n_2 , $n_1 > n_2$) quando l'onda incide con un angolo maggiore dell'angolo critico θ_c ($\sin(\theta_c) = n_2/n_1$)
 - Caso 1) Rifrazione e Riflessione:
 - Angolo incisione < Angolo Critico θ_c
 - Caso 2) Riflessione Interna Totale
 - Angolo incisione > Angolo Critico
 - La luce incidente non passa nel secondo mezzo

Immunosensore TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)



$$\sin(\theta_2) = 1 \rightarrow \theta_2 = 90 \rightarrow \text{NO RIFRAZIONE} \Rightarrow \text{RIFLESSIONE TOTALE}$$

$$\Rightarrow \theta_1 > \theta_c \quad \text{RIFLESSIONE TOTALE}$$

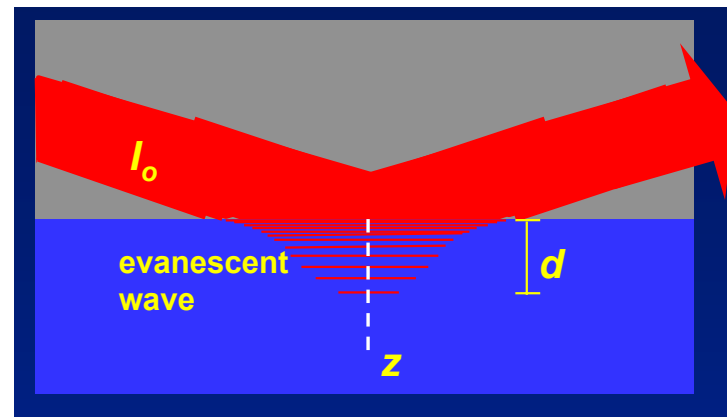
$$\sin(\theta_c) = \frac{n_2}{n_1}$$

Immunosensore TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)

- Analizzando il fenomeno con le equazioni di Maxwell si ottiene nel mezzo meno denso (n_2) un campo evanescente diretto perpendicolarmente all'interfaccia
 - L'intensità del campo evanescente decade esponenzialmente con la distanza (z) dall'interfaccia stessa

$$I = I_0 e^{-z/d_p} \quad d_p = \frac{\lambda}{4\pi(n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2)^{1/2}}$$

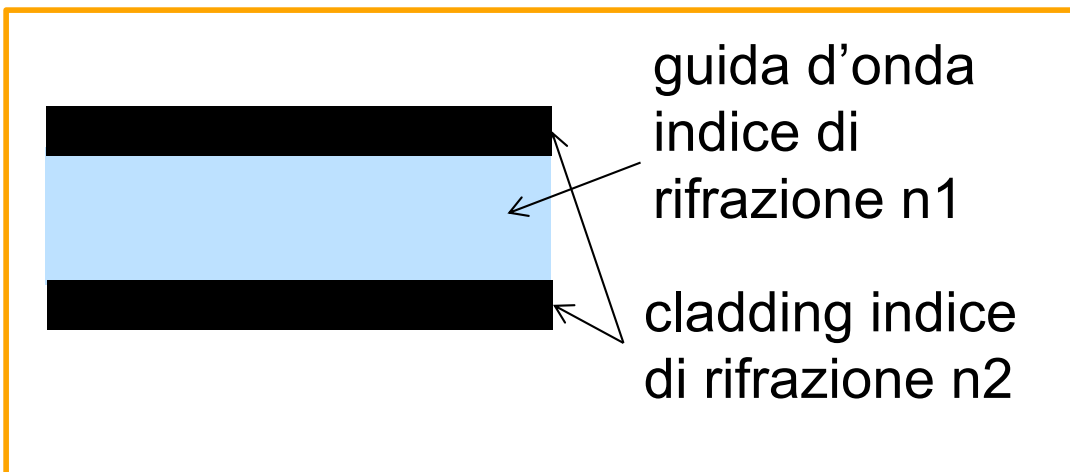
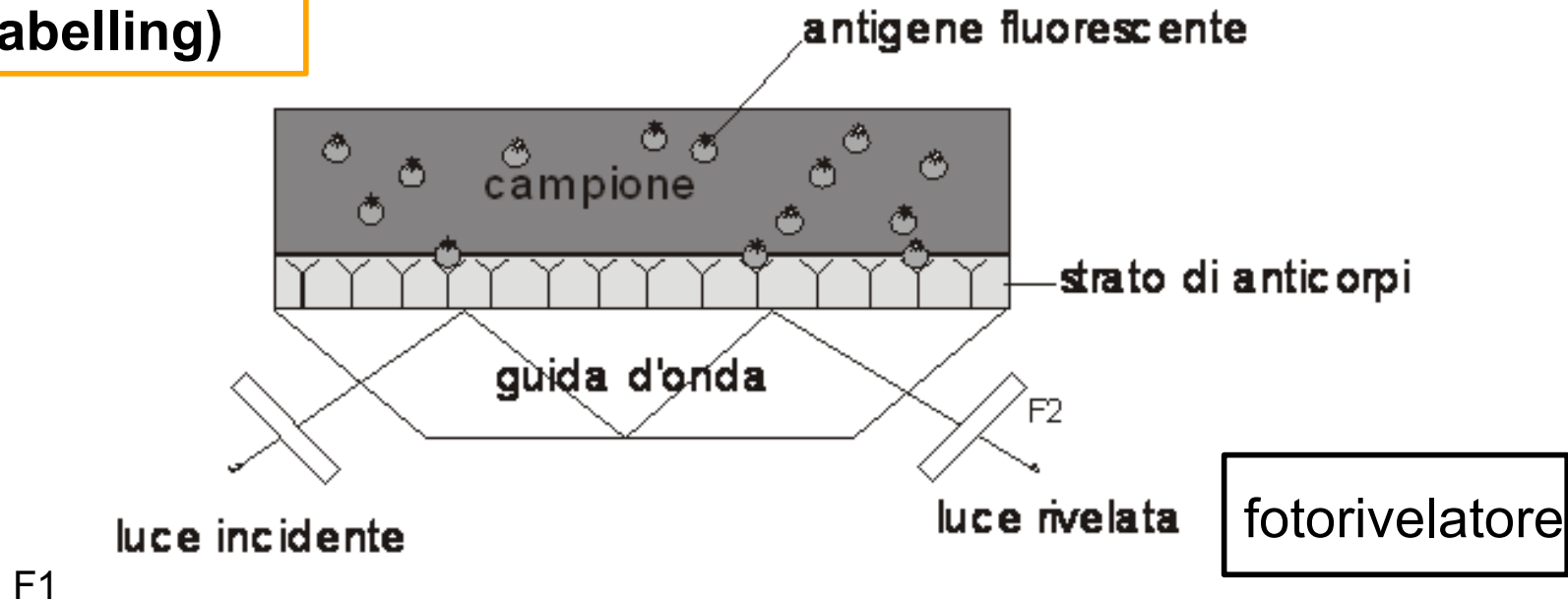
- d_p è detta profondità di penetrazione (intensità iniziale attenuata di $1/e$) ed è funzione della lunghezza d'onda λ , degli indici di rifrazione, e dell'angolo di incidenza. La profondità di penetrazione è una frazione della lunghezza d'onda della luce incidente.



- Le caratteristiche dell'onda riflessa sono modulate dalla struttura fisica, nello strato limitato dalla profondità di penetrazione, dell'interfaccia a più basso indice di rifrazione

Immunosensore TIRF

**Competitivo
(labelling)**

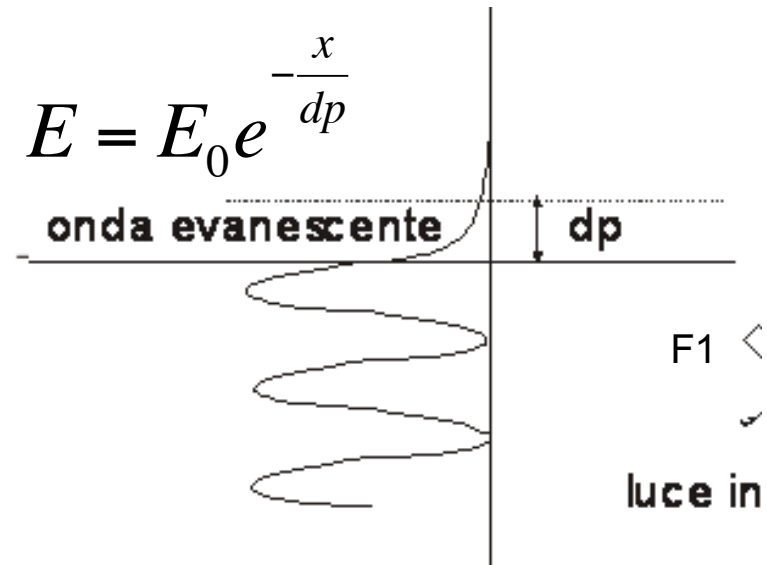


Strato anticorpale fissato sulla
guida d'onda

Filtro ottico F2 alla lunghezza
d'onda tipica della
fluorescenza della particella
attaccata all'antigene marcato

Immunosensore TIRF

- Nel caso di riflessione totale interna esiste un campo evanescente che penetra nello strato meno denso
- L'intensità del campo evanescente diminuisce all'aumentare della distanza tra interfaccia guida/cladding
- **dp** profondità di penetrazione
- **dp** è una frazione della lunghezza d'onda della luce incidente
- Spessore strato anticorpale < dp
- **L'onda evanescente interagisce con lo strato anticorpale e quindi con Ag marcato**
- Per questo motivo **l'onda riflessa all'interno della guida conterrà una lunghezza d'onda tipica della fluorescenza**
- Il filtro ottico **F2** estrae questa lunghezza d'onda e l'intensità associata viene letta da un fotorilevatore



All'aumentare di [Ag] diminuisce l'intensità del segnale luminoso associato

Immunosensore TIRF

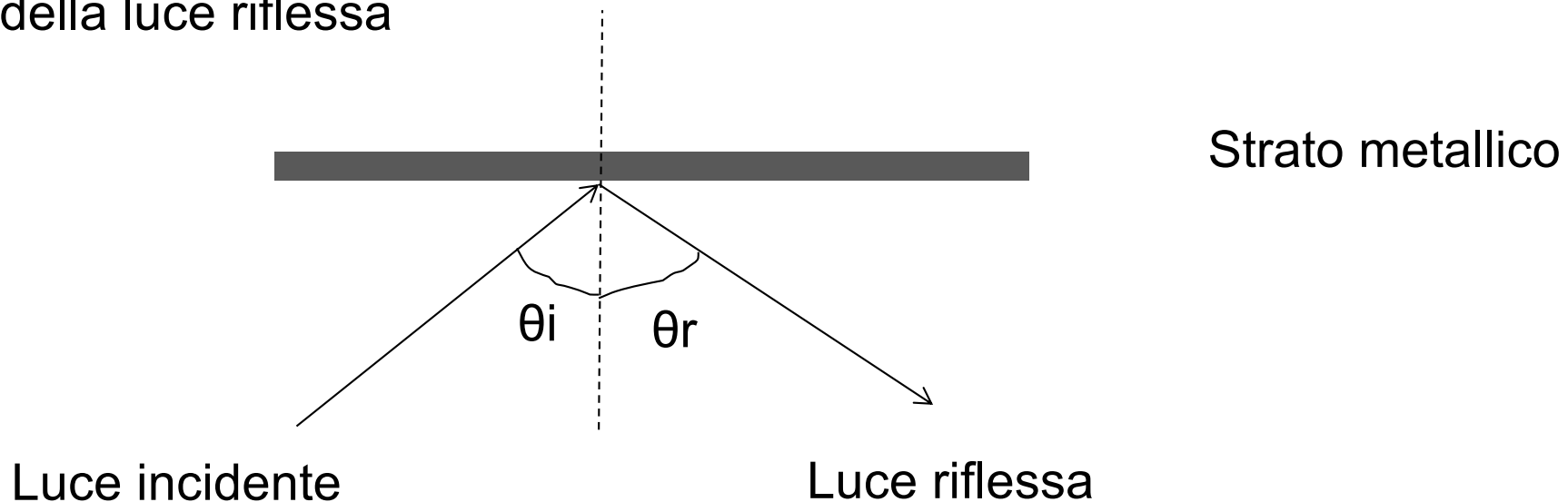
Principio di funzionamento della misura

- Le guide d'onda, sulle quali si immobilizzano gli anticorpi, rappresentano l'elemento di riflessione interna in cui la luce incide ad un angolo superiore all'angolo critico in modo tale da avere riflessioni interne multiple.
- La reazione antigene-anticorpo avviene all'interfaccia anticorpo soluzione e il composto che si forma ha uno spessore notevolmente inferiore rispetto alla lunghezza d'onda della luce incidente
- L'onda evanescente penetra nel mezzo meno denso per frazioni della lunghezza d'onda
- L'onda evanescente interagisce con le molecole fluorescenti, in questo modo l'onda riflessa contiene una lunghezza d'onda tipica della fluorescenza.
 - Il limite maggiore dei dispositivi a fluorescenza è la necessità di avere molecole fluorescenti e l'elevato segnale di sottofondo dovuto alle molecole fluorescenti presenti nel volume dove penetra l'onda evanescente.
 - Utilizzando un sistema con guide d'onda a doppio canale (uno di riferimento) per sottrarre il sottofondo, e con l'aiuto di indicatori fluorescenti molto efficaci, è possibile rivelare concentrazioni addirittura femtomolari.

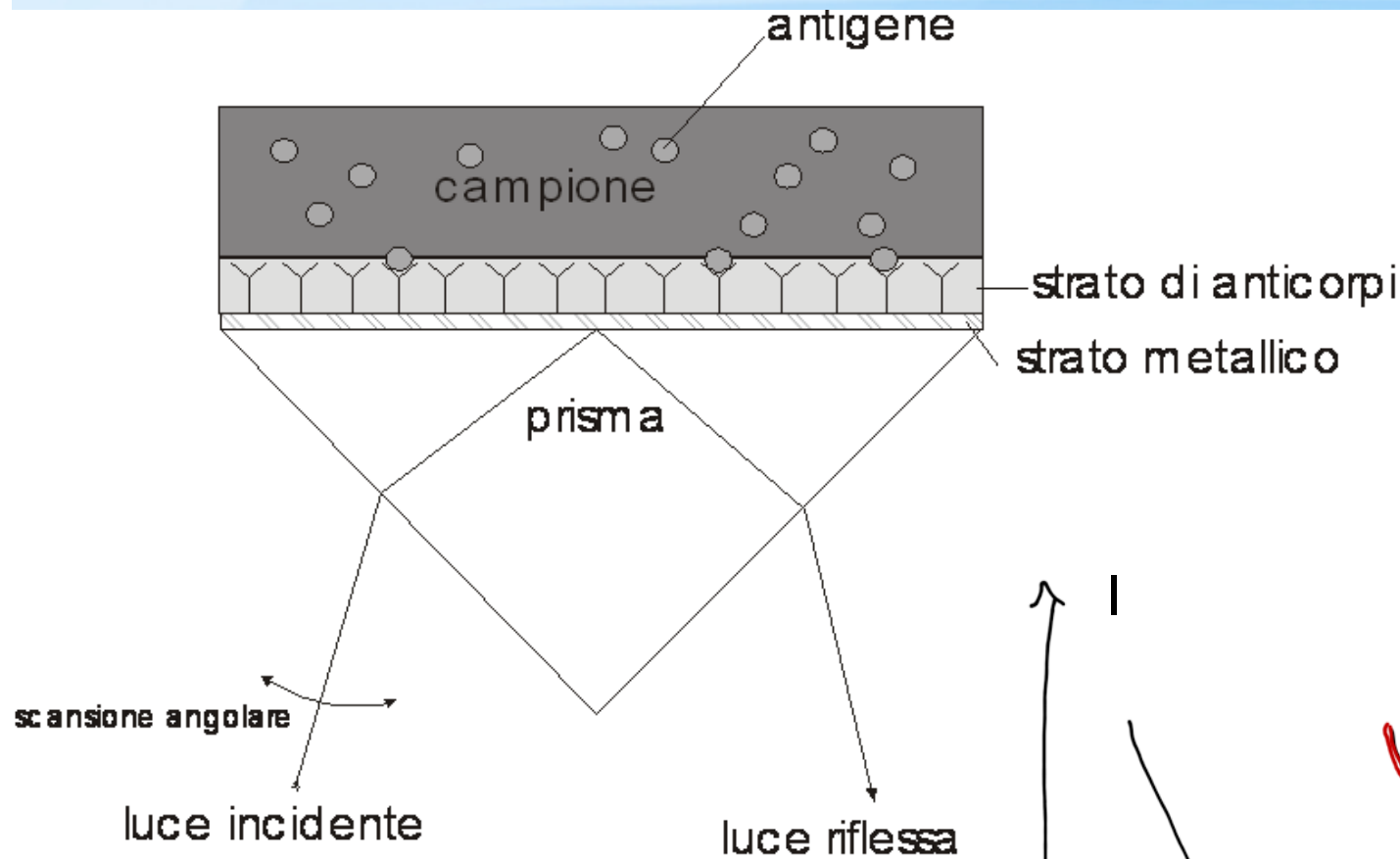
Immunosensore SPR

Surface Plasmon Resonance (SPR)

- I plasmoni rappresentano i quanti delle oscillazioni delle cariche superficiali. Possono essere eccitati otticamente se una luce incidente viene riflessa da un sottile strato metallico.
- Esiste un angolo di incidenza (θ_0) per cui si instaura la risonanza dei plasmoni superficiali che corrisponde ad una drastica caduta di intensità della luce riflessa

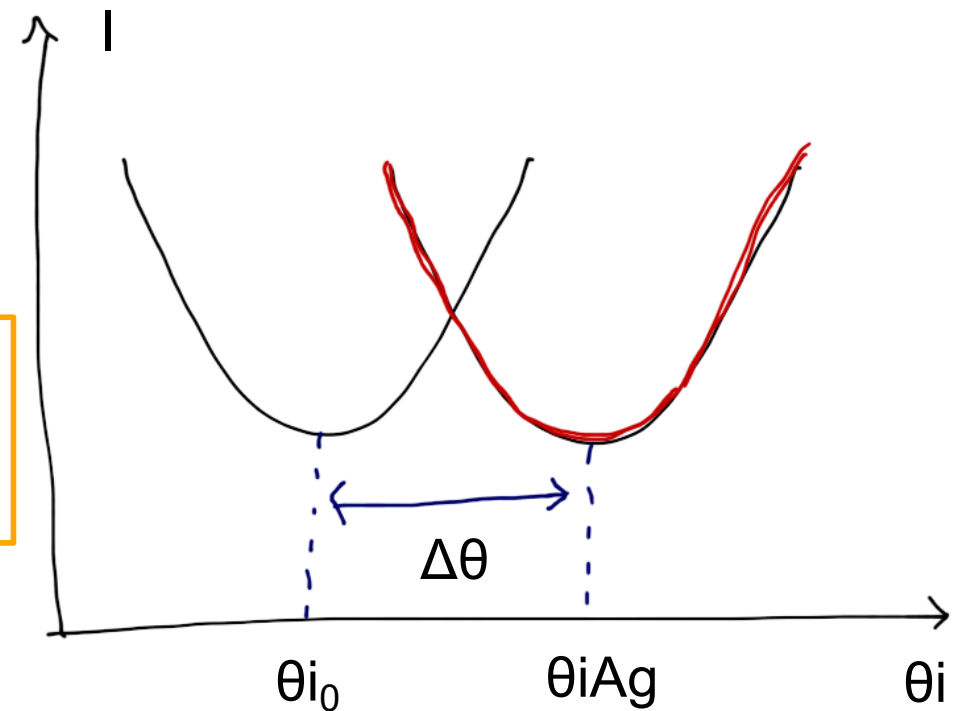


Sensore SPR (Risonanza di Plasmoni Superficiali)



**Diretto
(no labelling)**

Si osserva una traslazione del picco di risonanza che cresce all'aumentare degli Ac legati

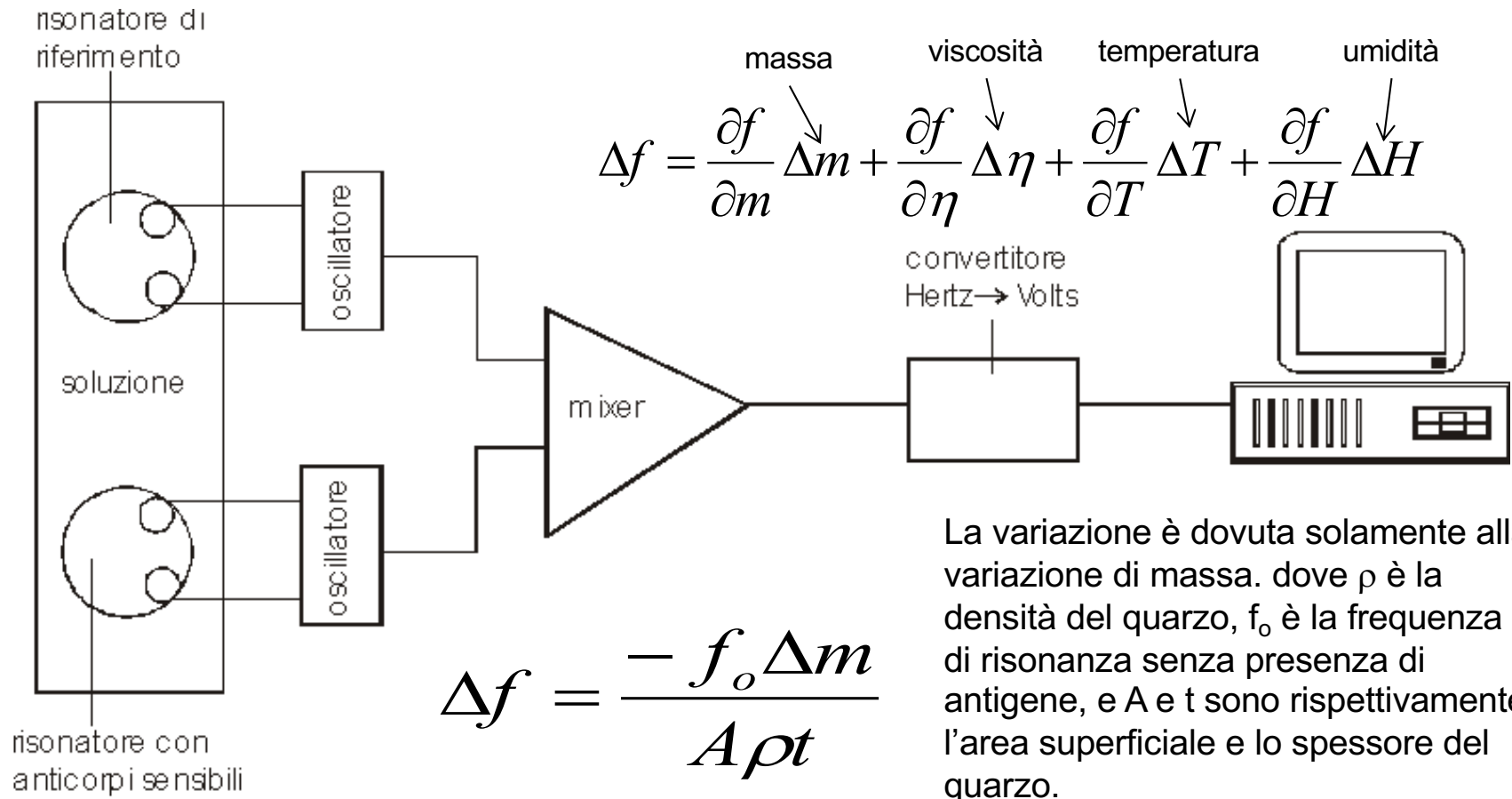


Immunosensore a risonanza plasmoni superficiali (SPR)

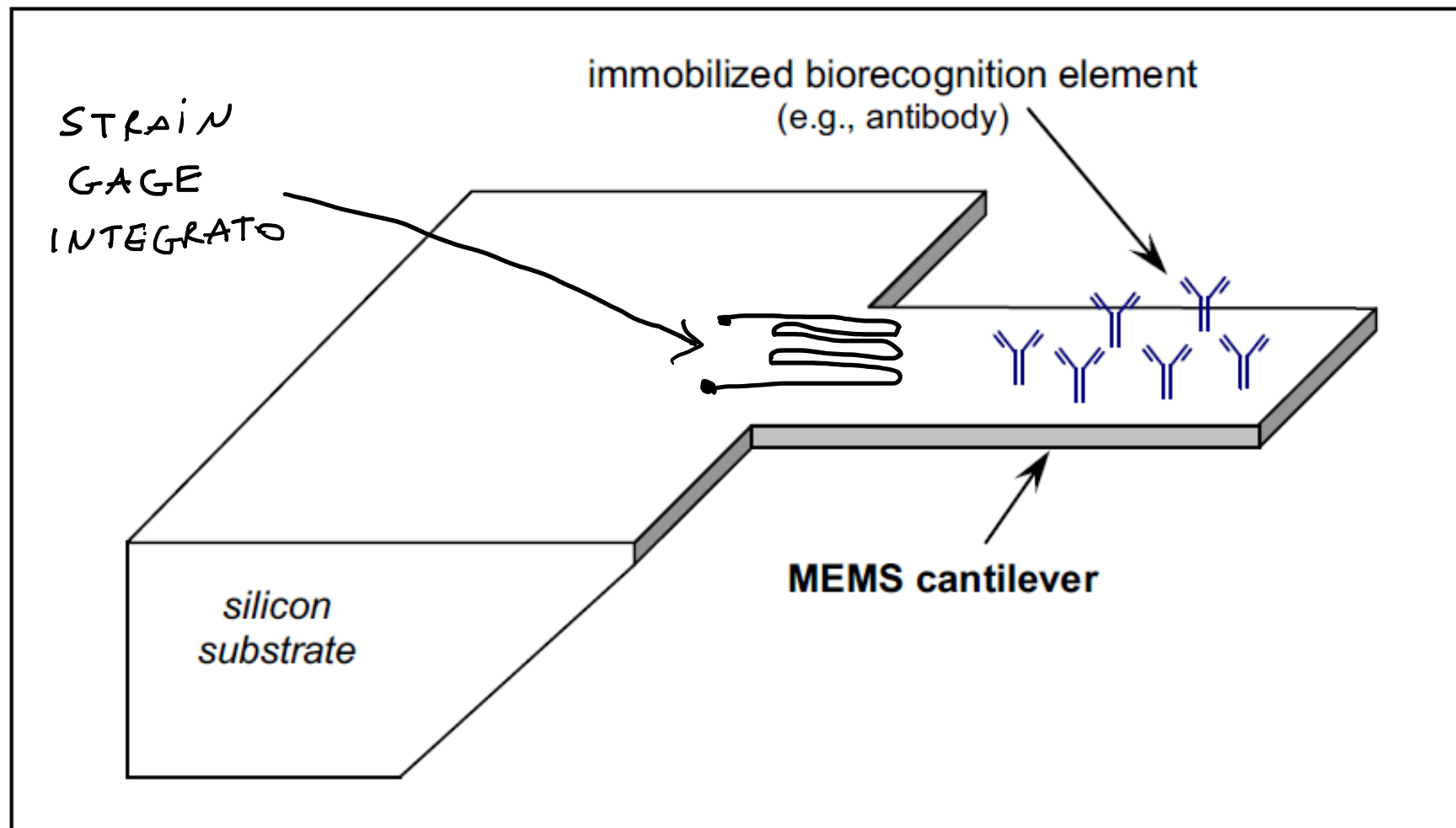
- La grandezza fisica rivelata è l'intensità luminosa (I) in funzione dell'angolo di incidenza.
 - La risonanza si manifesta come una brusca caduta dell'intensità luminosa riflessa.
 - Dapprima si studia il sistema in assenza del campione da analizzare. Con tale configurazione la posizione e la profondità del picco dipendono dalle caratteristiche ottiche del metallo.
 - Introducendo il campione da analizzare vengono alterate le condizioni di risonanza. La traslazione angolare del minimo dipende dallo stato dei legami dello strato anticorpale
 - Tale proprietà ha consentito una vasta applicazione dei dispositivi SPR in campo biomedico ed ambientale.
 - Lo svantaggio principale di questa tecnica è che la sensibilità dipende dal peso molecolare dell'antigene, e quindi basse concentrazioni di molecole molto piccole non sono facilmente rivelabili.

Immunosensore a quarzo risonante

- Metodo gravimetrico basato su oscillatori a cristalli di quarzo
- Il principio di funzionamento è basato sul cambiamento di frequenza di risonanza di un cristallo di quarzo con variazione di peso, viscosità o densità del fluido a contatto con esso. Il cristallo di quarzo viene inserito in un circuito oscillante e la frequenza di risonanza del sistema rispetto ad un quarzo di riferimento viene rivelata con un frequenzimetro.



Immunosensori gravimetrici MEMS



Esempi: biosensori in ambito cardiovascolare

- Malattie cardiovascolari (CVD) sono una delle principali causa di morte nel mondo
 - 40% decessi in UE
- CVD principali
 - Ipertensione
 - Ischemia cardiaca
 - scarso afflusso di sangue al cuore dalle arterie
 - Infarto miocardico acuto
 - sindrome acuta dovuta all'ostruzione di un arteria cardiaca. Provoca necrosi del tessuto cardiaco
 - Arteriosclerosi
 - malattia infiammatoria cronica delle arterie. Si ha un indurimento della parete arteriosa e la formazione di una placca arteriosclerotica il cui distacco può provocare dei trombi.
- **Problematica fondamentale:** tra i pazienti con dolori al petto e in stato di malore generale, riuscire a diagnosticare il prima possibile l'infarto miocardico acuto

Tecniche di recente sviluppo in cardiovascolare

▪ Approccio diagnostico

- misura di concentrazione di determinati **biomarcatori** che vengono rilasciati nella fase acuta dell'evento (e.g. infarto)
- Biomarcatori
 - **Troponine Cardiache:** Cardio Troponina-I (cTnI), Cardio Troponina-T (cTnT)
 - fanno parte della definizione di *infarto miocardico acuto* della *Società Europea di Cardiologia* e dell'*American College of Cardiology*
 - sono altamente specifiche e diverse da quelle che vengono rilasciate dai muscoli scheletrici
 - Vengono rilasciate dal muscolo cardiaco nelle prime ore dopo l'evento acuto. cTnT viene rilasciata immediatamente.
 - Concentrazione nel plasma < 1mg/mL (Low Level of Detection (LLD) = 0.1 mg/ml, minimo valore che è necessario rilevare)
 - Mioglobina
 - Peptide Natrieutico (NTP)
 - Proteina c-reattiva (CRP)
 - marker di processi infiammatori, recenti evidenze scientifiche hanno mostrato che questo marcatore potrebbe essere utilizzato per una diagnosi estremamente precoce
 - una concentrazione maggiore di 10 mg/L indica che uno stato infiammatorio è in corso

Troponine Cardiache: cTnI e cTnT

- Il complesso della troponina è presente unicamente nel muscolo striato ed è costituita dalla troponina T, troponina I e dalla troponina C. Le diverse isoforme, prodotte da geni distinti, presentano strutture e funzioni differenti.
- I livelli circolanti nel siero sono normalmente molto bassi, ma possono aumentare rapidamente dopo necrosi miocardica.
- Le isoforme cardiache delle troponine T e I sono quindi indicatori molto specifici e molto sensibili di danno miocardico.

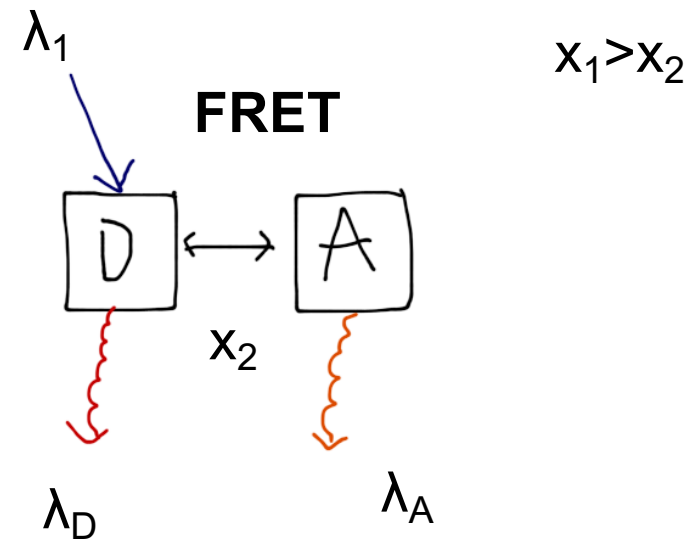
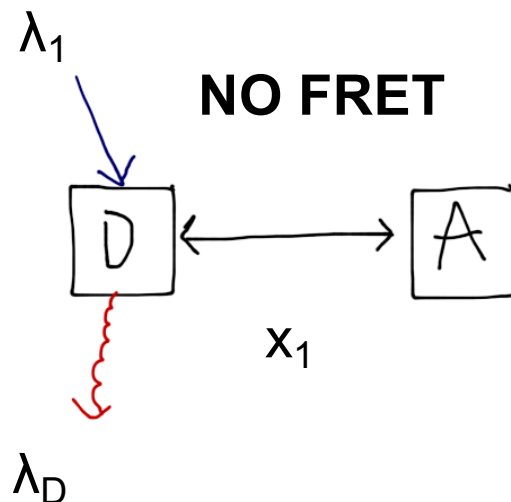
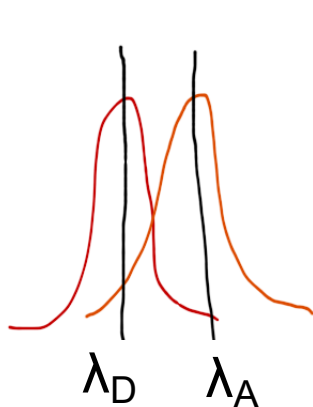
Tecniche di recente sviluppo in cardiovascolare

- Tecnica standard per diagnosticare l'infarto miocardico acuto
 - ELISA (Enzyme Lynked Immunosorbent Assay)
 - Si tratta di un metodo d'analisi immunologica usato in biochimica per rilevare la presenza di una sostanza usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima. La sostanza da rilevare può essere un antigene appartenente ad un patogeno.
 - L'anticorpo è legato ad un enzima. La lettura viene effettuata una volta atteso il tempo di legame Ag-Ac, iniettando il substrato relativo all'enzima e misurando la conseguente reazione come visto per i biosensori catalitici.
 - Problematiche
 - Lunghi tempi di preparazione
 - Labelling dell'anticorpo
 - Tempi di risposta troppo elevati
 - Necessità tecnologica
 - Sviluppare una tecnica di analisi per la diagnosi dell' infarto miocardico acuto che sia specifica, sensibile, a basso costo e veloce utilizzabile direttamente e in modo semplice nel point of care (ambulatorio medico, ambulanza..etc)
 - Esempio: biosensore per cTnT con LLD accettabile, bassi volumi di prelievo (20-50 μ L) e con **tempi di risposta inferiori al minuto**

Biosensore per cTnI

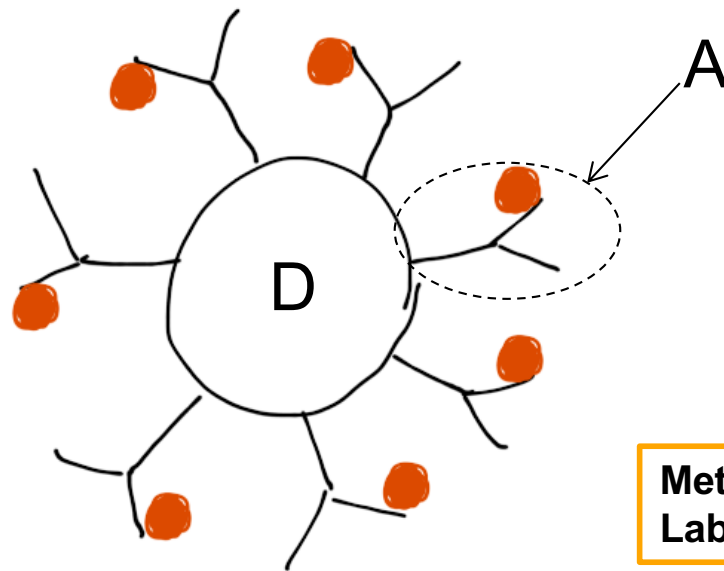
▪ Biosensori con tempi di risposta **inferiori al minuto**

- R. Cody Stringer, Daniel Hoehn, Sheila A. Grant “Quantum Dot-Based Biosensor for Detection of Human Cardiac Troponin I Using a Liquid-Core Waveguide” IEEE SENSORS JOURNAL, VOL. 8, NO. 3, MARCH 2008
- Utilizzo della tecnica FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer)
 - due molecole fluorescenti: donatore (D) e accettore (A) con spettri di emissione parzialmente sovrapposti
 - D viene eccitata da una luce incidente a lunghezza d'onda λ_1 e riemette un segnale luminoso a lunghezza d'onda λ_D . Se D e A sono vicine, distanza tipica di FRET 10-100Å, si ha un passaggio di energia da D ad A che emette a sua volta ad una lunghezza d'onda λ_A .
 - Vale: $\lambda_1 < \lambda_D < \lambda_A$.



Biosensore per cTnI

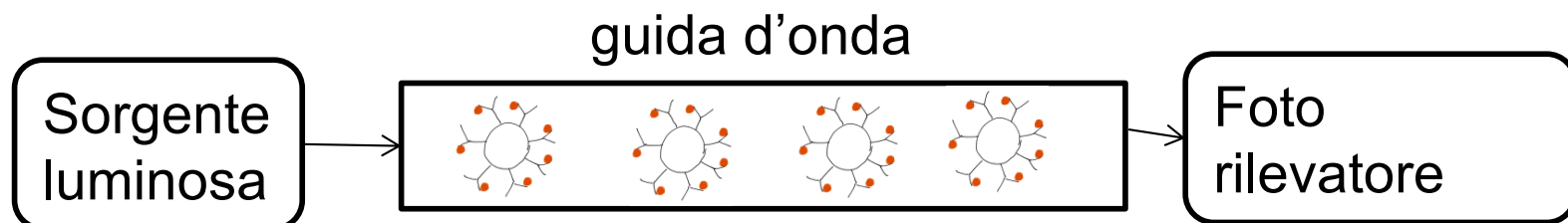
- D è un quantum dot (semiconduttore nanocristallino fluorescente) mentre A è il recettore: l'anticorpo anti-cTnI marcato con una particella fluorescente.
- A viene fatto aderire a D mediante tecniche di self assembling.



- D viene eccitato otticamente
- In condizioni normali si rilevano due picchi alle lunghezze d'onda di D e A
- Al formarsi del legame Ag-Ac la distanza tra A e D diminuisce e avviene il FRET. In questo una porzione di energia viene trasferita da D ad A .

**Metodo diretto
Labelling di Ag**

- La struttura così ottenuta viene immersa in una guida d'onda a core liquido nella quale verrà iniettata l'analita

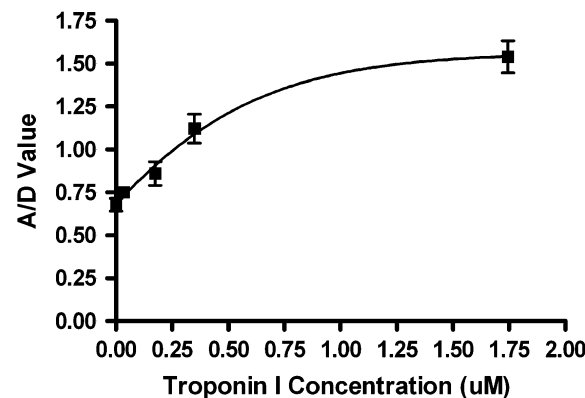
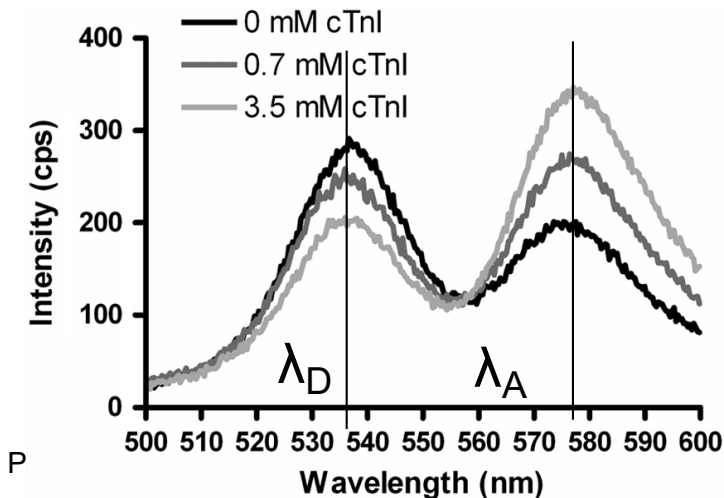


Biosensore per cTnI

– In assenza di legami

- Mi aspetto due picchi uno a λ_D e l'altro a λ_A
- All'aumentare della concentrazione dell'antigene avremo maggior trasferimento energetico (FRET) e quindi il picco a λ_A crescerà a discapito di quello a λ_D
- **E' stato verificato che il rapporto tra il picco di intensità a λ_A e quello a λ_D è funzione della concentrazione di TpnI**
- Caratteristiche del sensore:
 - LLD 32nM
 - Saturazione [TpnI]
 - volume di prelievo 20 uL
 - **Tempo di risposta < 1 minuto**

Il metodo ELISA
impiega circa 15
minuti



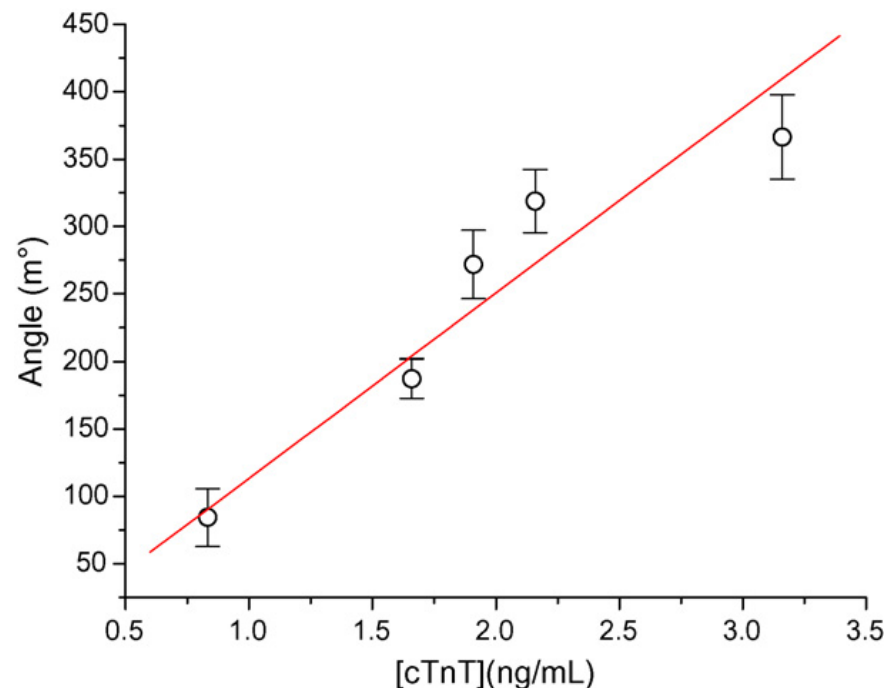
A un certo punto
si raggiunge la
saturazione (Ac
tutti legati)

Biosensore per cTnT

Metodo diretto
No labelling

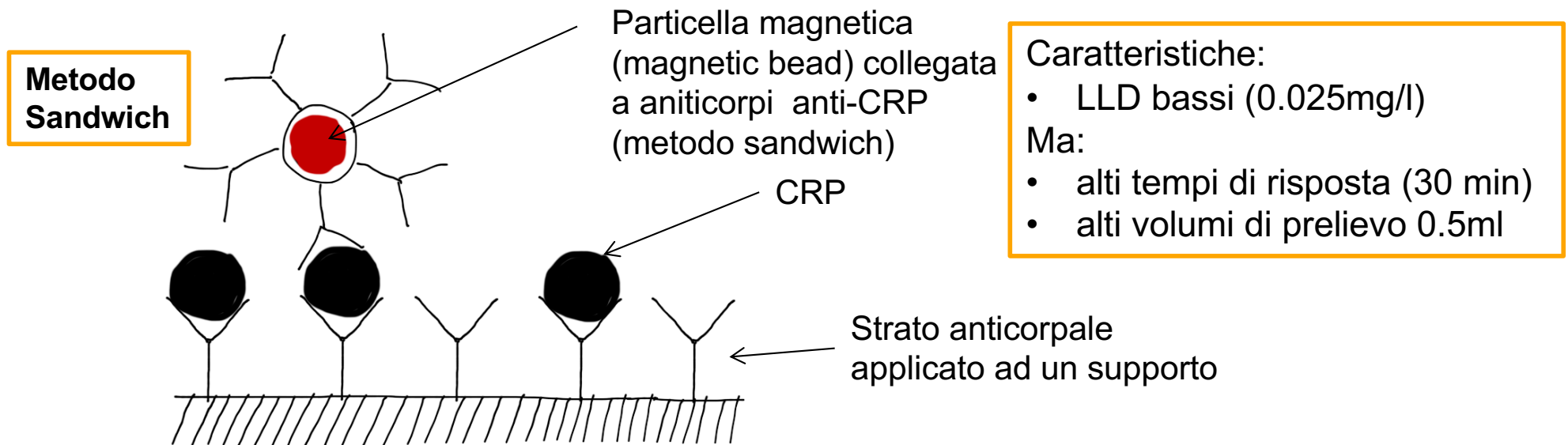
▪ Utilizzo di anticorpi specifici e tecnica SPR

- Rosa Fireman Dutra, Renata Kelly Mendes, Valdinete Lins da Silva, Lauro Tatsuo Kubota, Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 1744–1750
- E' stata verificata una relazione lineare tra [cTnT] e angolo di risonanza
 - ottenuta comparando l'uscita del sensore con un metodo standard (tipo ELISA)
- Caratteristiche
 - volumi di prelievo 20uL
 - **Tempi di risposta 12 Minuti**
 - Ancora troppo elevati!



Biosensore per CRP

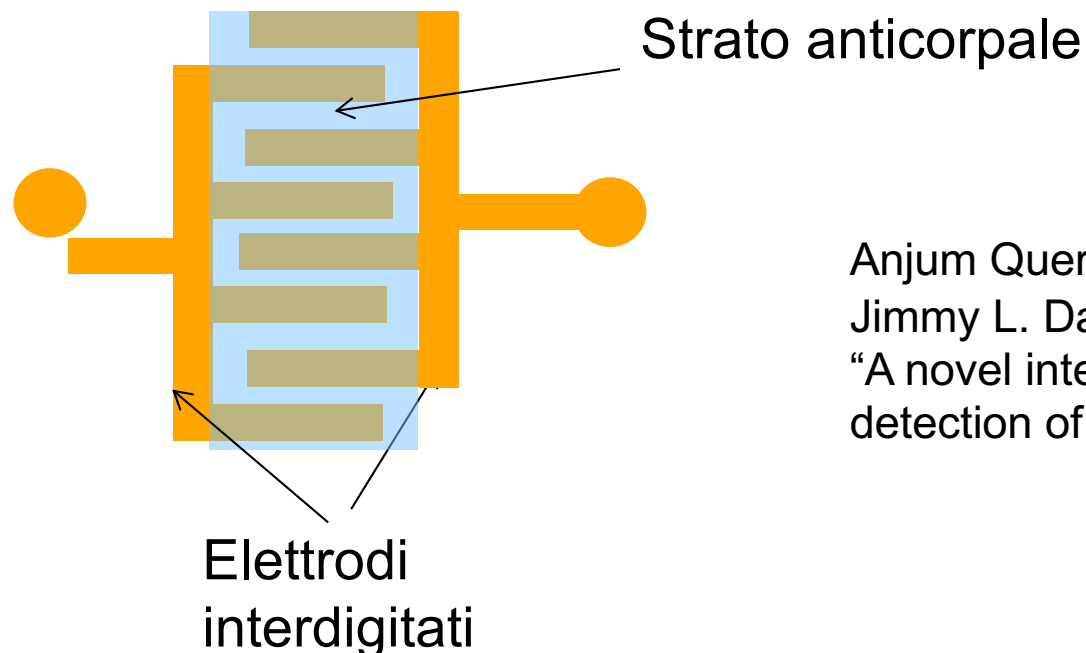
- Necessità tecnologica: rapida rilevazione di CRP direttamente nella saliva o nelle urine.
- Tecnica innovativa basata su nanoparticelle magnetiche (labelling magnetico di Ac)
 - Martin H.F. Meyer, Markus Hartmann, Hans-Joachim Krause, Gert Blankenstein, Birgit Mueller-Chorus, Juergen Oster, Peter Miethe, Michael Keusgen; “CRP determination based on a novel magnetic biosensor”; Biosensors and Bioelectronics 22 (2007) 973–979



Eccitando elettro-magneticamente questa struttura si ottiene un segnale ritrasmeso la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di CRP

Biosensore ad elettrodi interdigitati

- Struttura ad elettrodi interdigitati ricoperta da un ossido sul quale vengono immobilizzati gli Ac di interesse (esempio anti-CRP, anti-TnPI/T)
- Si forma un condensatore piano la cui capacità varia con il numero di anticorpi legati
 - in pratica varia la costante dielettrica relativa (ϵ_r) del mezzo contenuto tra le due facce del condensatore ($C = \epsilon_0 \epsilon_r S/d$)
 - Caratteristiche
 - no labelling, veloce nella risposta, economico, integrabile su silicio



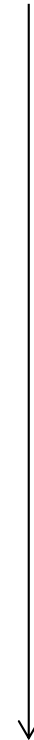
Anjum Quershia, Yasar Gurbuza, Weng P. Kangb,
Jimmy L. Davidsonb
“A novel interdigitated capacitor based biosensor for
detection of cardiovascular risk marker”

Scenario del monitoraggio tramite biosensori

- Monitoraggio ex-vivo e discontinuo
- Monitoraggio continuo ex-vivo
- Monitoraggio continuo in-vivo

Oggi

Futuro



Problematiche di biocompatibilità