



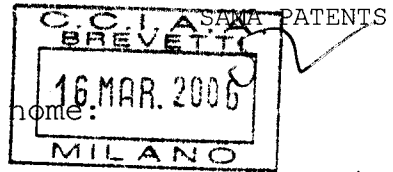
MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102006901396148
Data Deposito	16/03/2006
Data Pubblicazione	16/09/2007

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
G	01	N		

Titolo

USO DI PERFLUOROPOLIMERI NELLA DETERMINAZIONE DELLA COSTANTE DI LEGAME
RECETTORE-LIGANDO



Descrizione dell'invenzione industriale a nome:
SOLVAY SOLEXIS S.p.A., di nazionalità italiana, con sede in
Milano, Via Turati, 12.

* * * * *

MI 2006A000480

La presente invenzione riguarda un metodo semplice ed efficiente per la determinazione quantitativa di interazioni di ligandi con recettori adsorbiti sulla superficie di un polimero mediante misurazione diretta dell'intensità di luce riflessa.

Più in particolare, la presente invenzione si riferisce ad un metodo per la determinazione quantitativa di interazioni di ligandi con recettori nel quale si utilizzano superfici planari di materiali polimerici perfluorurati.

Nell'arte nota sono stati proposti numerosi metodi per determinare interazioni tra ligandi e recettori, cioè le affinità di legame (binding affinities) di sistemi reversibili ligando-recettore, di interesse chimico, biochimico o biologico. Un elenco delle principali metodologie è riportato in *Angew. Chem. Int. Ed.* 1998, 37, pagina 2785. Le metodologie note comprendono in genere l'immobilizzazione del recettore su un'appropriata superficie piana e la misurazione, diretta o indiretta, delle variazioni di certe proprietà della superficie, ad esempio ottiche, dopo che i ligandi sono stati messi a contatto con la superficie. Dette variazioni sono indotte dalla formazione di coppie recettore-ligando.

Una classe di metodi richiede l'etichettatura (labelling) del ligando in soluzione, cioè la modifica covalente del ligando con specie fluorescenti, luminescenti o radioattive. Si veda ad esempio la domanda di brevetto US 2004/0014.060 A1. Tuttavia occorre notare che la modifica del ligando è un'operazione molto complessa e lunga, e difficilmente può essere impiegata in prove di screening dove viene usata una notevole varietà di ligandi. Inoltre il metodo richiede un'operazione aggiuntiva di allontanamento dal sistema, mediante lavaggio (washing out), dei ligandi liberi, cioè di quelli che non hanno interagito coi recettori e che interferiscono con la misurazione. Un ulteriore svantaggio di detto metodo è che l'interazione ligando-recettore può essere influenzata dalla modifica chimica del ligando in seguito al labelling.

Un'altra classe di metodi che simulano più efficacemente le interazioni recettore-ligando, ad esempio quelle che avvengono sulla superficie di una membrana cellulare, sfrutta direttamente le variazioni indotte su una superficie dalla formazione del legame nella coppia recettore-ligando, senza modificare il ligando con sostanze labelling. Un esempio di detto metodo usa il biosensore BIAcore, commercializzato da Pharmacia Biosensor AB (Uppsala, Sweden) descritto ad esempio nei brevetti USP 5.313.264, e USP 5.374.563. In questo biosensore, in cui si utilizza il principio della Surface

Plasmon Resonance (SPR) (si veda l'articolo Jiri Homola, Sinclair S. Yee, Gunter Gauglitz, Surface plasmon resonance sensors: review, Sensors and Actuators B, vol. 54 (1999), pagg. 3-15), un'onda ottica evanescente si accoppia con plasmoni superficiali di strati sottili (50 nm) di materiali conduttori quali argento o oro, e genera un fenomeno di risonanza a specifici angoli. Questo permette di determinare la variazione dell'indice di rifrazione dello(degli) strato(i) di materiale(i) adsorbito(i) sul metallo, ad esempio una coppia ligando-ricettore. Da questa variazione si ricavano le costanti di legame tra ligando e recettore.

Questo metodo, pur essendo molto usato in pratica, è piuttosto complesso e costoso e non è sempre accurato nella determinazione delle costanti di legame. Si veda ad esempio la pubblicazione "Use of surface plasmon resonance to probe the equilibrium and dynamic aspects of interactions between biological macromolecules", di Peter Schuck, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1997, 26, pagg. 541-566. Detto metodo, infatti, si basa su una rilevazione indiretta della massa adsorbita mediante l'effetto che essa ha sulla velocità di propagazione di un plasmone, che a sua volta determina l'angolo di accoppiamento di un fascio laser.

I problemi legati all'uso del metodo BIAcore per la determinazione delle costanti di legame (binding constants) dipendono in gran parte dalla complessità del metodo:

- il segnale misurato dipende dalle proprietà fisiche di ben cinque materiali tramite una dipendenza funzionale complessa che include parametri non noti a priori. I cinque materiali menzionati sono: supporto di vetro o materiali affini, strato sottile di conduttore sul supporto, strato polimerico che consente la funzionalizzazione della superficie metallica, molecole che aderiscono per interazione e soluzione acquosa;
- la sensibilità e l'accuratezza della misura dipendono dallo spessore e dalla qualità superficiale dello strato di materiale conduttore che costituisce il sensore. Si veda la pubblicazione "Optical properties and instrumental performances of thin gold films near the surface plasmon resonance" di H. Neff et al., Thin solid films, 2006, 496, pagg. 688-697;
- le misure si basano sulla rilevazione dell'intensità luminosa a vari angoli, questo richiede una strumentazione capace di scansioni angolari ad elevata risoluzione ed è costituita da parti in movimento ad alta precisione o da matrici di fotorivelatori di adeguata risoluzione spaziale. Si veda l'articolo "Quantitative interpretation of the response of surface plasmon resonance sensors to adsorbed films" di L.S. Jung et al, Langmuir, 1998, 14, pagg. 5636-5648.

Tali problemi si manifestano:



- nella non concordanza tra i valori di costante di affinità determinati attraverso le cinetiche di adsorbimento e quelli ricavati all'equilibrio;
- nell'impossibilità di stimare a priori l'ampiezza del segnale che si genera in seguito alla formazione sulla superficie di coppie recettore-ligando. Infatti il segnale dipende da parametri non noti a priori.

Era quindi sentita l'esigenza di avere a disposizione un metodo semplice per la determinazione di interazioni tra ligandi e recettori che sfruttasse direttamente le variazioni indotte dall'interazione ligando-recettore su una superficie polimerica, superando gli inconvenienti della tecnica nota.

E' stato ora inaspettatamente e sorprendentemente trovato che è possibile ovviare ai suddetti inconvenienti con un metodo ottico quantitativo che permette la determinazione delle affinità di legame (binding affinities) di specie molecolari in equilibrio termodinamico mediante il metodo qui di seguito descritto.

Costituisce un oggetto della presente invenzione l'uso di superfici piane comprendenti polimeri perfluorurati nella determinazione della costante di legame di due specie molecolari interagenti utilizzando misurazioni di intensità di luce riflessa, detta superficie comprendente almeno una molecola con la funzione del recettore adsorbita su detta superficie, e almeno un ligando che interagisce col recettore.



Preferibilmente le superfici piane sono sostanzialmente costituite da polimeri perfluorurati.

Più in particolare, nell'uso secondo la presente invenzione le misurazioni comprendono le seguenti fasi:

- (a) addizione ad una soluzione acquosa in contatto con la superficie del polimero perfluorurato, semicristallino o amorfo, preferibilmente amorfo, di una successione di volumi noti di una soluzione acquosa contenente da 1 nanogrammo/ml a 10 milligrammi/ml in concentrazione di molecole con la funzione del recettore, quali anticorpi, o altri complessi proteici oppure tensioattivi anfifilici terminati con un recettore, eventualmente miscelate con ad altre molecole (intercalanti) che non hanno funzioni di recettore, misurando dopo ogni addizione l'intensità della luce riflessa dall'interfaccia tra la soluzione acquosa e la superficie polimerica e riportando il valore misurato all'equilibrio su un diagramma in funzione della concentrazione di recettori progressivamente addizionata, fino al raggiungimento di un valore asintotico dell'intensità di luce misurata;
- (b) addizione alla soluzione ottenuta nella fase (a) di una successione di volumi noti di una soluzione acquosa di un ligando a concentrazione nota, misurando dopo ogni addizione l'intensità della luce riflessa dall'interfaccia tra la soluzione acquosa e il materiale

polimerico e riportando il valore misurato all'equilibrio su un diagramma in funzione della concentrazione di ligandi $[T_0]$ progressivamente addizionati, fino al raggiungimento di un valore asintotico e interpolando (fitting) i dati di intensità di luce riflessa I in funzione delle aggiunte di ligando con la formula:

$$I = c I_0 (R^\perp \sin^2 \varphi + R^{\parallel} \cos^2 \varphi) + I_N \quad (1)$$

dove

I_0 rappresenta l'intensità di luce incidente sull'interfaccia,

c è un fattore che tiene conto dell'eventuale rugosità della superficie e vale 1 solo nel caso di superficie planare,

I_N è l'intensità di luce misurata dal rivelatore in assenza del polimero,

φ è l'angolo formato dalla direzione di polarizzazione della luce con il piano di incidenza,

R^\perp e R^{\parallel} sono i coefficienti di riflessione ricavati dalle formule di Fresnel per uno strato sottile rispettivamente nel caso di polarizzazione perpendicolare e parallela al piano di incidenza e dipendono dalla quantità di ligando in contatto con i recettori adsorbiti sull'interfaccia secondo la formula di adsorbimento di Langmuir, da cui si ottiene la costante K di legame recettore-ligando.

Le formule di Fresnel per lo strato sottile possono essere quelle, ad esempio, descritte in F.L. Pedrotti, L.S. Pedrotti, "Introduction to Optics", Prentice Hall, New Jersey, 1993, pagg. 393-395; R.D. Guenther, "Modern Optics", John Wiley & Sons, pagg. 67-83.

Infatti la quantità di ligando legato al recettore in funzione delle aggiunte di ligando è espressa da una funzione nota come "isoterma di Langmuir", che dipende dalla concentrazione di recettori e dalla costante di affinità detta anche costante di legame. Per l'isoterma di Langmuir si veda, ad esempio, Paul C. Hiemenz, "Principles of Colloid and Surface Chemistry", Marcel Dekker, New York, 1997, pagg. 287-298.

L'interpolazione dei dati di intensità riflessa viene effettuata inserendo il volume di ligando adsorbito nelle formule di Fresnel per la riflessione da strati sottili. Ne risulta una funzione dipendente dagli indici di rifrazione di acqua, materiale polimerico e materiale adsorbito, nonché dalla concentrazione superficiale di recettori e dalla costante di affinità.

Il metodo della presente invenzione è applicabile per qualsiasi angolo di incidenza e qualsiasi polarizzazione della luce.

Il rapporto tra la variazione dell'intensità di luce conseguente ai ricoprimenti molecolari e dell'intensità di luce di fondo misurata prima della fase (a) può essere variato

per migliorare la sensibilità del metodo sia modificando l'angolo di incidenza e/o l'angolo di raccolta della luce, che variando la polarizzazione della luce incidente e/o misurando le variazioni di polarizzazione della luce rilevata.

In particolare, nel caso di angolo di incidenza della luce di 45°, di polarizzazione perpendicolare al piano di incidenza ($\varphi = 90^\circ$), di differenza Δn tra gli indici di rifrazione della soluzione e del substrato polimerico minore o uguale a 0,012, e di spessore dello strato molecolare di recettori adsorbiti e ligandi interagenti minore di 15 nm, l'intensità riflessa I può essere espressa secondo la seguente formula (2) approssimata con un errore minore dell' 1% rispetto all'equazione completa (1):

$$I = 2I_0 \left(\frac{\pi V m N_a}{\lambda A \rho} \right)^2 \frac{(n_a^2 - n_0^2)(n_a^2 n_0^2 - n_0^4 + 2n_a^2 \Delta n)}{n_0^4} \left([T_0] + K^{-1} + [S_0] - \sqrt{([T_0] + K^{-1} + [S_0])^2 - 4[T_0][S_0]} \right)^2 + I_b \quad (2)$$

dove

I_0 , $[T_0]$, Δn sono come sopra definiti,

n_a , m , ρ sono rispettivamente l'indice di rifrazione, la massa molecolare e la densità del ligando,

V è il volume della soluzione acquosa,

A è l'area della superficie di materiale polimerico su cui avviene l'adsorbimento del recettore,

λ la lunghezza d'onda della luce incidente, n_0 è l'indice di rifrazione della soluzione acquosa,

I_b l'intensità misurata prima dell'aggiunta di recettori (prima della fase (a)),

$[S_0]$ è la concentrazione molare di siti di legame recettore-ligando, e

K è la costante di affinità (detta anche costante di legame). Essendo gli altri parametri noti, dall'adeguamento (fitting) dell'equazione (2) ai valori misurati di intensità riflessa, si ricava la concentrazione $[S_0]$ di recettori adsorbiti sulla superficie e la costante di affinità K per l'interazione ligando-recettore.

Come detto, i parametri noti, nel senso che sono misurabili o già noti, sono caratteristici della coppia ligando-recettore, una volta definita la coppia.

I perfluoropolimeri della superficie sono scelti, ad esempio, tra:

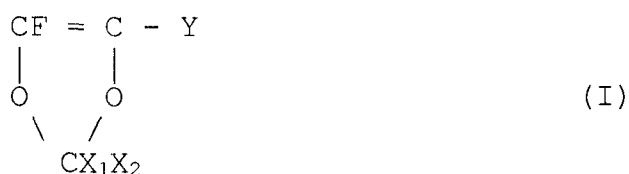
- 1) omopolimero del tetrafluoroetilene (PTFE), o copolimeri semicristallini del tetrafluoroetilene (TFE);
- 2) copolimeri amorfi del TFE;
- 3) omopolimeri amorfi di anelli diossolici perfluorurati.

Preferibilmente i perfluoropolimeri utilizzati nel presente metodo sono scelti tra:

- 1) copolimeri semicristallini del tetrafluoroetilene (TFE) contenenti dallo 0,5% fino a circa il 10% in moli, il limite massimo essendo tale che il copolimero sia semicristallino, di uno o più comonomeri fluorurati, quali

ad esempio perfluoroalchilvinileteri (PAVE), preferibilmente scelti tra perfluorometilviniletere, perfluoroetilviniletere, perfluoropropilviniletere; perfluorodiossoli; esafluoropropene (HFP);

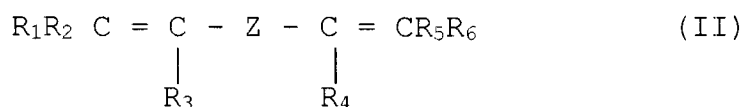
- 2) copolimeri amorfi del TFE con altri monomeri fluorurati, quali ad esempio perfluoroalchil-vinileteri (PAVE), perfluorodiossoli di formula



dove

Y è uguale a F oppure a OR_f dove R_f è un perfluoroalchile avente da 1 a 5 atomi di carbonio; preferibilmente Y è uguale ad OR_f ; X_1 e X_2 , uguali o diversi tra loro, sono -F o $-\text{CF}_3$; preferibilmente nella formula (I) X_1 , X_2 sono -F; R_f è preferibilmente $-\text{CF}_3$, $-\text{C}_2\text{F}_5$ o $-\text{C}_3\text{F}_7$; più preferibilmente i fluorodiossoli di formula (I) sono quelli in cui Y è uguale a OR_f in cui R_f è $-\text{CF}_3$ e X_1 , X_2 sono -F (i.e. 2,2,4-trifluoro-5-trifluorometossi-1,3-diossolo (TTD)) (si veda ad esempio EP 633.257); esafluoropropene (HFP); perfluoroossialchilvinileteri, opzionalmente contenenti monomeri "cure-site" contenenti atomi di bromo o iodio (si veda ad esempio USP 4.745.165) oppure atomi di iodio o bromo in

posizione terminale nella catena polimerica (si veda ad esempio USP 5.173.553); bis-olefine aventi formula generale:

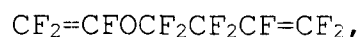
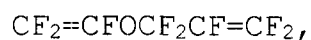


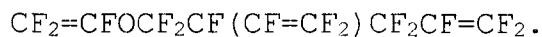
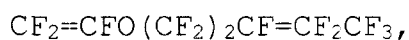
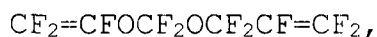
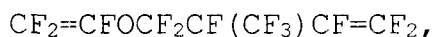
dove:

$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$, uguali o diversi tra loro, sono H oppure alchili C_1-C_5 , Z è un radicale alchilenico o cicloalchilenico C_1-C_{18} , lineare o ramificato, eventualmente contenente atomi di ossigeno, preferibilmente almeno parzialmente fluorurato, oppure un radicale (per)fluoropolioossilchilenico (si veda ad esempio USP 5.585.449);

- 3) omopolimeri amorfi di un perfluorodiossido di formula (I) come sopra definito.

Nella classe 2), come comonomero del TFE in alternativa al perfluorodiossido di formula (I), si possono usare monomeri bis-olefinici contenenti atomi di ossigeno che ciclizzano durante la polimerizzazione, ad esempio quelli descritti in USP 4.910.276, dando anelli diossolanici. In particolare si possono, ad esempio, citare i seguenti comonomeri:





Più preferibilmente il perfluoropolimero è un perfluoropolimero amorfo.

Preferibilmente vengono utilizzati i polimeri perfluorurati della classe 2) e 3), in particolare i copolimeri amorfi del TFE contenenti dal 20% all'80% in moli del perfluorodiossido di formula (I), preferibilmente contenenti il TTD. Ancor più preferiti sono i copolimeri del TFE contenenti dal 20% al 60% in moli di TTD.

I polimeri della presente invenzione possono essere ottenuti con vari metodi noti nell'arte, ad esempio coagulando lattici acquosi contenenti particelle di perfluoropolimeri ottenuti per polimerizzazione dei monomeri, in emulsione acquosa, preferibilmente in presenza di una microemulsione di (per)fluoropolioossilchileni, secondo quanto descritto nei brevetti USP 4.864.006, USP 4.789.717, EP 250.766, USP 6.297.334 e nella pubblicazione "Polymerization of fluorinated monomers in perfluoropolyether microemulsion", Giannetti E., Chittofrati A., Sanguineti A., La chimica e l'industria, Ottobre 1997, RICHMAC Magazine, qui integralmente incorporati per riferimento.

La superficie polimerica può essere liscia o presentare



rugosità di tipo regolare o irregolare, e può essere ottenuta mediante tecniche note quali stampaggio, anche attraverso l'applicazione di pressione dovuta a gas inerti, preformatura, estrusione oppure mediante formazione di film per evaporazione, per casting, per spin-coating, per dip-coating. I film polimerici impiegabili in detto metodo di misurazione hanno preferibilmente uno spessore di 1 micron o superiore. La rugosità della superficie può essere controllata durante l'ottenimento della stessa, ad esempio attraverso l'opportuna scelta di solventi o temperature di formazione del film oppure modificando la superficie già formata attraverso operazioni di lappatura, imprinting, oppure con l'utilizzo di solventi. La rugosità della superficie del polimero può introdurre una componente di luce diffusa che tuttavia non va a svantaggio del presente metodo, essendo anch'essa proporzionale ai ricoprimenti molecolari della superficie, in maniera analoga alla luce riflessa. In questo caso è possibile misurare l'intensità della luce anche in una direzione diversa da quella della riflessione geometrica.

Quali molecole o complessi molecolari con la funzione di recettori vengono utilizzati quelli che generano un monostrato adsorbito sulla superficie solida. Tale adsorbimento può essere dovuto alle interazioni di tipo idrofobico fra le molecole di recettori e la superficie



solida.

Come detto, si possono utilizzare come recettori tensioattivi, ad esempio quelli non ionici anfifilici che generano un monostrato (self assembled monolayer) sulla superficie solida. L'ottenimento di detto monostrato può essere verificato effettuando la fase (a) del presente metodo e osservando il raggiungimento di un valore asintotico di detto diagramma.

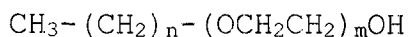
Le molecole di recettori, come detto, possono essere utilizzate in miscela con molecole intercalanti che non hanno funzione di recettore. In genere queste ultime possono essere scelte tra tensioattivi e proteine. Inoltre le molecole utilizzate come intercalanti non devono avere interazioni specifiche, cioè non devono formare un legame con il ligando da analizzare. L'assenza di tale interazione può essere verificata effettuando la fase (a) del metodo secondo l'invenzione con l'impiego delle sole molecole intercalanti e facendo seguire la fase (b) verificando che non vi siano variazioni di intensità della luce riflessa.

I tensioattivi, sia recanti siti recettori sia come intercalanti, possono essere scelti tra tensioattivi non ionici, ad esempio glicolipidi, ossietileni o ossipropileni; oppure tra tensioattivi ionici: per esempio anionici, sodio bis-2-etilesil-solfosuccinato (AOT), oppure cationici quali didodecil-dimetilammonio bromuro (DDAB).



Fra i tensioattivi non ionici impiegabili si possono citare ad esempio:

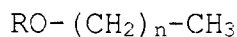
a) composti non ionici aventi struttura



in cui $6 < n < 18$ e $3 < m < 12$,

ad esempio il composto commerciale Brj 56 (Fluka, cas. No. 9004-95-9), dove $n=15$ e m è distribuito attorno al valore $m=10$;

b) alchil glicosidi con la seguente struttura



in cui $6 < n < 12$ e R = residuo del glucosio o maltosio, ad esempio il composto commerciale n-dodecil-beta-D-maltoside della Aldrich.

I tensioattivi non ionici anfifilici terminati con un recettore vengono preparati per reazione dei tensioattivi con recettori secondo processi noti nell'arte.

La coppia recettore-ligando è definita come una coppia di molecole, ad esempio proteine, acidi nucleici, glicoproteine, carboidrati, ormoni, aventi un'affinità capace di stabilire un legame più o meno stabile. In particolare si possono citare anticorpo/antigene, enzima/inibitore, carboidrato/carboidrato, proteina/DNA, DNA/DNA, peptide/peptide.

Nelle fasi (a) e (b) dell'uso secondo l'invenzione, le misurazioni delle intensità di luce riflessa vengono effettuate in condizioni di equilibrio termodinamico, cioè



rilevando l'intensità di luce riflessa con intervalli regolari di tempo, in genere di 0,5-5 minuti, fino al raggiungimento di un valore costante. E' stato trovato che il tempo necessario per raggiungere l'equilibrio termodinamico dipende dal tipo di coppia recettore-ligando utilizzata. Pertanto le misure effettuate possono permettere di stimare le cinetiche di assorbimento-desorbimento.

Il metodo della presente invenzione permette di rilevare fino a 3 microgrammi di ligando per millilitro, corrispondenti ad un limite di sensibilità sulla massa adsorbita per superficie di 0,04 nanogrammi/mm², cioè nell'ordine delle tecniche più sensibili dell'arte nota. La misura della riflessione da un'area planare di 1 mm² permette di rilevare quantità di 3 nanogrammi di materia adsorbita senza limiti intrinseci di concentrazione minima in soluzione.

E' sorprendente e inaspettato che la riflessione della luce sia risultata efficace per individuare e misurare direttamente, mediante misure di intensità di luce riflessa, le interazioni tra ricettori e ligandi secondo il metodo della presente invenzione. Infatti la tipica riflettività della superficie di un solido è enormemente più grande di quella di un singolo strato molecolare. Invece l'impiego di un perfluoropolimero che supporta una molteplicità di recettori permette di utilizzare il fenomeno della riflessione della luce nella misurazione dell'interazione



ligando-recettore.

Seguono alcuni esempi a scopo illustrativo ma non limitativo della presente invenzione.

ESEMPI

Esempio 1

Misura della costante di legame fra la proteina Bovine Serum Albumin coniugata con biotina (BSA biotinilata, ligando) e Avidina (recettore)

Fase (a)

Un prisma retto di un copolimero del TFE contenente il 60% in moli di perfluorordiossido TTD, ottenuto attraverso lavorazione meccanica di un manufatto formato a caldo, avente lato 3 cm e superficie liscia lavorata meccanicamente tramite lappatura, è stato immerso in 1,5 millilitri di acqua.

Un fascio di luce proveniente da un laser He-Ne da 5 milliwatt viene fatto incidere normalmente sulla faccia retta del prisma non a contatto con la soluzione acquosa. La riflessione avviene all'interfaccia tra il lato maggiore del prisma e la soluzione acquosa posta a contatto con esso. Il fascio riflesso esce dal secondo lato minore del prisma e viene rilevato da un fotodiode amplificato che converte l'intensità di luce riflessa in un segnale elettrico.

All'acqua viene aggiunta una soluzione acquosa 0,02 millimolare di proteina Avidina (commercializzata da Aldrich, cas. No. 1405-69-2), in porzioni di 4 microlitri ciascuna,

per un totale di 20 microlitri. La soluzione viene tenuta costantemente sotto agitazione.

Dopo ogni aggiunta è stata misurata per 2 minuti l'intensità della luce riflessa dalla faccia del prisma. I valori di intensità misurati (pallini in figura) vengono diagrammati in funzione della concentrazione ottenuta di Avidina espressa in mg/ml, ottenendo la curva qui di seguito riportata.

La progressiva ricopertura della faccia immersa nella soluzione da parte della proteina aggiunta è osservabile dalla variazione dell'intensità della luce misurata dal fotodiode.

La ricopertura completa è chiaramente rivelata dal raggiungimento di un valore asintotico dell'intensità della luce misurata.

Fase (b)

Alla soluzione ottenuta in (a), in cui è immerso il prisma, dopo il raggiungimento del valore asintotico, viene aggiunta una soluzione acquosa 5 micromolare di Bovine Serum Albumin coniugata con biotina (commercializzata da Pierce, prod. No. 29130), a porzioni di 20 microlitri ciascuna. La soluzione viene tenuta costantemente sotto agitazione. Dopo ogni aggiunta viene misurata l'intensità della luce riflessa come nella fase (a).

I valori di intensità misurati (triangoli in figura)

vengono diagrammati in funzione della concentrazione ottenuta di proteine e aggiunti alla curva diagrammata nella fase (a).

La formazione dei legami BSA-biotina-Avidina è rivelata dall'aumento dell'intensità della luce misurata fino al raggiungimento di un valore asintotico che indica saturazione dei siti di legame dell'Avidina con la biotina.

Adeguando (fitting) ai dati di intensità di luce riflessa in funzione delle aggiunte di BSA-biotina la formula di adsorbimento di Langmuir si ottiene la costante di legame recettore-ligando. La costante di legame ottenuta è $2,6 \times 10^9$ litri \times moli⁻¹.

Esempio 2

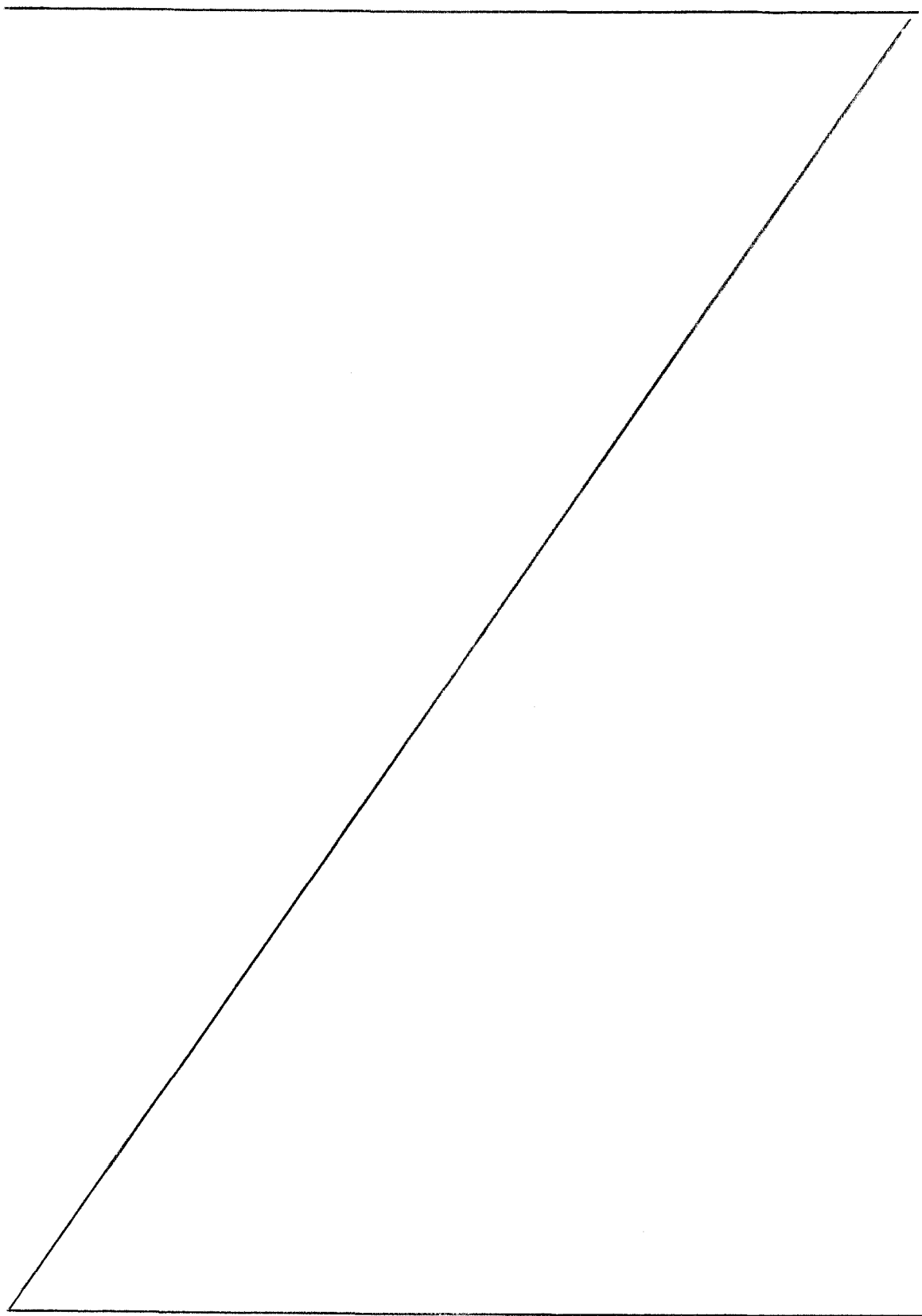
E' stato ripetuto l'esempio 1 ma usando, in sostituzione del prisma, un film sottile dello stesso copolimero impiegato nell'esempio 1, ottenuto mediante casting e avente uno spessore di 17 micrometri. Detto film è stato montato in una cornice quadrata di plexiglas avente la funzione di sostegno con lato esterno di lunghezza 1,4 cm e lato interno di 0,4 cm.

Su tale film è fatto incidere un fascio di luce laser come nell'esempio 1, con angolo di 45° sulla superficie del film. Un fotodiode amplificato, disposto ad angolo retto con la direzione della luce uscente dal laser, converte l'intensità di luce in un segnale elettrico.

Vengono poi ripetute tutte le operazioni descritte

✓

nell'esempio 1 ottenendo una costante di legame di $3,7 \times 10^9$
litri \times moli⁻¹.



RIVENDICAZIONI

1. Uso di superfici piane comprendenti polimeri perfluorurati nella determinazione della costante di legame di due specie molecolari interagenti utilizzando misurazioni di intensità di luce riflessa, detta superficie comprendente almeno una molecola con la funzione del recettore adsorbita su detta superficie, e almeno un ligando che interagisce col recettore.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui le misurazioni comprendono le seguenti fasi:
 - (a) addizione ad una soluzione acquosa in contatto con la superficie del polimero perfluorurato, di una successione di volumi noti di una soluzione acquosa contenente da 1 nanogrammo/ml a 10 milligrammi/ml in concentrazione di molecole con la funzione del recettore, misurando dopo ogni addizione l'intensità della luce riflessa dall'interfaccia tra la soluzione acquosa e la superficie polimerica e riportando il valore misurato all'equilibrio su un diagramma in funzione della concentrazione di recettori progressivamente addizionata, fino al raggiungimento di un valore asintotico dell'intensità di luce misurata;
 - (b) addizione, alla soluzione ottenuta nella fase (a), di una successione di volumi noti di una soluzione acquosa di un ligando a concentrazione nota, misurando

dopo ogni addizione l'intensità della luce riflessa dall'interfaccia tra la soluzione acquosa e il materiale polimerico e riportando il valore misurato all'equilibrio su un diagramma in funzione della concentrazione di ligandi $[T_0]$ progressivamente addizionati, fino al raggiungimento di un valore asintotico e interpolando (fitting) i dati di intensità di luce riflessa I in funzione delle aggiunte di ligando con la formula:

$$I = c I_0 (R^\perp \sin^2 \varphi + R^\parallel \cos^2 \varphi) + I_N \quad (1)$$

dove

I_0 rappresenta l'intensità di luce incidente sull'interfaccia,

c è un fattore che tiene conto dell'eventuale rugosità della superficie e vale 1 solo nel caso di superficie planare,

I_N è l'intensità di luce misurata dal rivelatore in assenza del polimero,

φ è l'angolo formato dalla direzione di polarizzazione della luce con il piano di incidenza,

R^\perp e R^\parallel sono i coefficienti di riflessione ricavati dalle formule di Fresnel per uno strato sottile rispettivamente nel caso di polarizzazione perpendicolare e parallela al piano di incidenza,

detti R^I e R^{II} essendo dipendenti dalla quantità di ligando in contatto con i recettori adsorbiti sull'interfaccia secondo la formula di adsorbimento di Langmuir, da cui si ottiene la costante K di legame recettore-ligando.

3. Uso secondo la rivendicazione 2, in cui le molecole con la funzione del recettore sono scelte tra anticorpi, complessi proteici, tensioattivi anfifilici terminati con un recettore, opzionalmente dette molecole essendo miscelate con altre molecole (intercalanti) che non hanno funzioni di recettore.
4. Uso secondo le rivendicazioni 1-3, in cui quando l'angolo di incidenza della luce è di 45° , la polarizzazione è perpendicolare al piano di incidenza ($\varphi = 90^\circ$), la differenza Δn tra gli indici di rifrazione della soluzione e del substrato polimerico è minore o uguale a 0,012 e lo spessore dello strato molecolare di recettori adsorbiti e ligandi interagenti è minore di 15 nm, l'intensità riflessa I è espressa secondo la seguente formula (2) approssimata con un errore minore del 1% rispetto all'equazione completa (1):

$$I = 2I_0 \left(\frac{\pi V m N_s}{\lambda A \rho} \right)^2 \frac{(n_a^2 - n_0^2)(n_a^2 n_0^2 - n_0^4 + 2n_a^2 \Delta n)}{n_0^4} \left([T_0] + K^{-1} + [S_0] - \sqrt{([T_0] + K^{-1} + [S_0])^2 - 4[T_0][S_0]} \right)^2 + I_b \quad (2)$$

dove



I_o , $[T_o]$, Δn sono come sopra definiti,

n_a , m , ρ sono rispettivamente l'indice di rifrazione, la massa molecolare e la densità del ligando,

V è il volume della soluzione acquosa, A è l'area della superficie di materiale polimerico su cui avviene l'adsorbimento del recettore,

λ la lunghezza d'onda della luce incidente,

n_o è l'indice di rifrazione della soluzione acquosa,

I_b l'intensità misurata prima dell'aggiunta di recettori (prima della fase (a)),

$[S_o]$ è la concentrazione molare di siti di legame recettore-ligando,

K è la costante di affinità detta anche costante di legame,

$[S_o]$ e K essendo ricavabili dall'adeguamento (fitting) dell'equazione (2) ai valori misurati di intensità riflessa, essendo noti gli altri parametri dell'equazione (2).

5. Uso secondo le rivendicazioni 1-4, in cui il polimero perfluorurato è un polimero semicristallino oppure amorfo, preferibilmente amorfo.
6. Uso secondo le rivendicazioni 1-5, in cui il perfluoropolimero è scelto tra:
 - 1) omopolimero del tetrafluoroetilene (PTFE), o copolimeri semicristallini del tetrafluoroetilene (TFE);

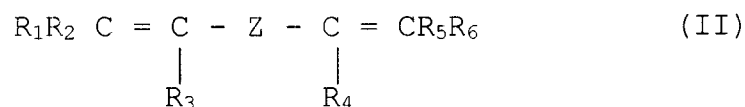
- ✓
- 2) copolimeri amorfi del TFE;
 - 3) omopolimeri amorfi di anelli diossolici perfluorurati.
7. Uso secondo la rivendicazione 6, in cui il perfluoropolimero è scelto tra:
- 1) copolimeri semicristallini del tetrafluoroetilene (TFE) contenenti dallo 0,5% fino a circa il 10% in moli, il limite massimo essendo tale che il copolimero sia semi-cristallino, di uno o più comonomeri, quali ad esempio perfluoroalchilvinileteri (PAVE), preferibilmente scelti tra perfluorometilvinil etero, perfluoroetilvinil etero, perfluoropropilvinil etero; perfluorodiossoli, esafluoropropene (HFP);
 - 2) copolimeri amorfi del TFE con altri monomeri fluorurati, quali ad esempio perfluoroalchilvinileteri (PAVE), perfluorodiossoli, preferibilmente di formula



dove

Y è uguale a F oppure a OR_F dove R_F è un perfluoroalchile avente da 1 a 5 atomi di carbonio;

preferibilmente Y è uguale ad OR_f; X₁ e X₂, uguali o diversi tra loro, sono -F o -CF₃; preferibilmente nella formula (I) X₁, X₂ sono -F; R_f è preferibilmente -CF₃, -C₂F₅ o -C₃F₇; più preferibilmente i fluorodiossoli di formula (I) sono quelli in cui Y è uguale a OR_f in cui R_f è -CF₃ e X₁, X₂ sono -F (i.e. 2,2,4-trifluoro-5-trifluoro-metossi-1,3-diossolo (TTD)); esafluoropropene (HFP); perfluoroossialchil vinileteri, opzionalmente contenenti monomeri "cure-site" contenenti atomi di bromo o iodio oppure atomi di iodio o bromo in posizione terminale nella catena polimerica; bis-olefine aventi formula generale:



dove:

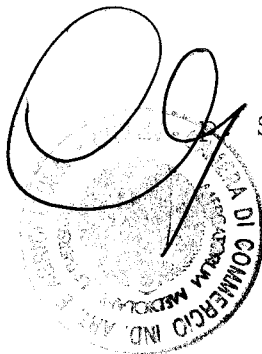
R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, uguali o diversi tra loro, sono H oppure alchili C₁-C₅, Z è un radicale alchilenico o cicloalchilenico C₁-C₁₈, lineare o ramificato, eventualmente contenente atomi di ossigeno, preferibilmente almeno parzialmente fluorurato, oppure un radicale (per)fluoropoliossalchilenico;

3) omopolimeri amorfi di un perfluorodiossolo di

formula (I) come sopra definito.

8. Uso secondo la rivendicazione 7, in cui nella classe 2) come comonomero del TFE, in alternativa al perfluorodiossido di formula (I), sono utilizzati monomeri bisolefinici contenenti atomi di ossigeno che ciclizzano durante la polimerizzazione formando anelli diossolanici.
9. Uso secondo la rivendicazione 8, in cui i comonomeri bisolefinici sono scelti tra:
- $$\text{CF}_2=\text{CFOCF}_2\text{CF}=\text{CF}_2,$$
- $$\text{CF}_2=\text{CFOCF}_2\text{CF}_2\text{CF}=\text{CF}_2,$$
- $$\text{CF}_2=\text{CFOCF}_2\text{CF}(\text{CF}_3)\text{CF}=\text{CF}_2,$$
- $$\text{CF}_2=\text{CFOCF}_2\text{OCF}_2\text{CF}=\text{CF}_2,$$
- $$\text{CF}_2=\text{CFO}(\text{CF}_2)_2\text{CF}=\text{CF}_2\text{CF}_3,$$
- $$\text{CF}_2=\text{CFOCF}_2\text{CF}(\text{CF}=\text{CF}_2)\text{CF}_2\text{CF}=\text{CF}_2.$$
10. Uso secondo le rivendicazioni 5-9, in cui i polimeri perfluorurati sono quelli della classe 2) e 3), preferibilmente i copolimeri amorfi del TFE contenenti dal 20% all'80% in moli del perfluorodiossido di formula (I), più preferibilmente contenente TTD.
11. Uso secondo la rivendicazione 10, in cui il polimero è scelto tra i copolimeri del TFE contenenti dal 20% al 60% in moli di TTD.

Milano, **16 MAR. 2006**

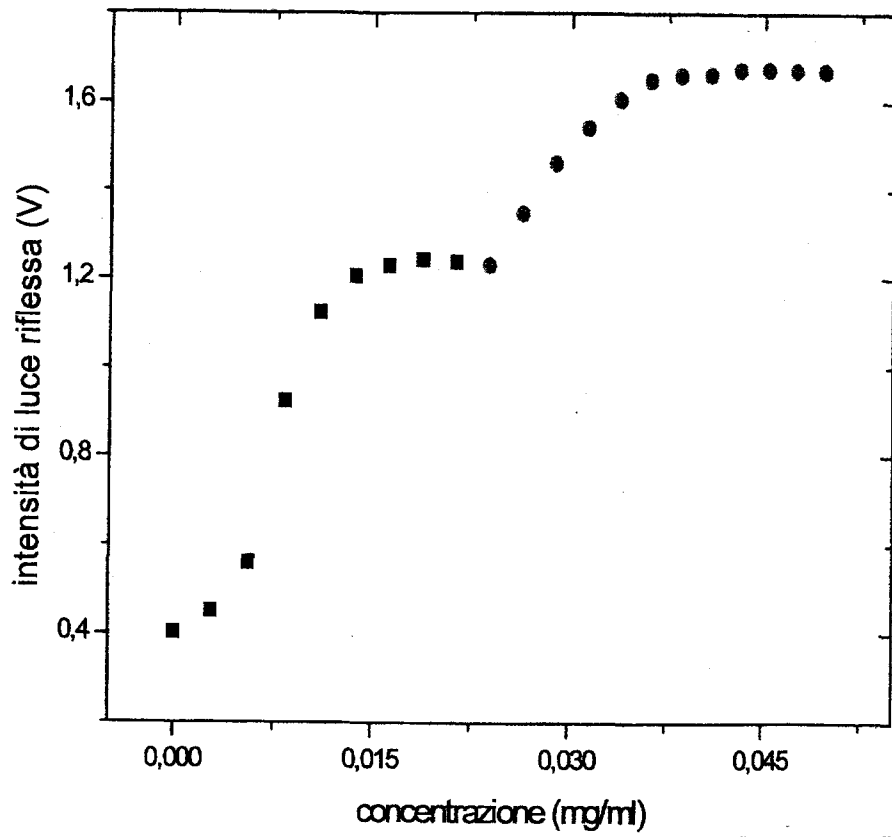


SOLVAY SOLEXIS S.p.A.

SAMA PATENTS

Daniele Sama

1/1



MI 2006A000480

