



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00983

(22) Data de depozit: 27/11/2017

(41) Data publicării cererii:
30/08/2018 BOPI nr. 8/2018

(71) Solicitant:
• DDS DIAGNOSTIC S.R.L., STR.SEGOVIA
NR. 1, BL.C8, SC.3, AP.39, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• MIHAILESCU CARMEN MARINELA,
STR.ARMASUL MARCU NR.11, BL.24,
SC.1, ET.7, AP.48, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• STAN DANA, STR. SEGOVIA NR. 1,
BL. C8, SC. 3, AP. 39, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE ȘABLON SELECTIV
PENTRU DETECȚIA ELECTROCHIMICĂ "LABEL FREE"
A ADIPONECTINEI DIN PROBE BIOLOGICE UMANE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor șabloane selective pentru detecția electrochimică a adiponectinei din probe biologice umane. Procedeu, conform invenției, constă în curățarea electrochimică a suprafeței unui electrod de aur policristalin prin imersia în apă, izopropanol, etanol câte 10 min, apoi uscare, verificarea gradului de curățare prin metoda spectrometriei de impedanță electrochimică, înregistrarea spectrelor voltamogramei ciclice prin baleierea pe domeniul de potențial 0...0,9 V în soluție de tampon fosfat, cu viteză de scanare de 50 mV și 10 mV, electro-

polimerizarea electrodului cu 2 mM fenol în soluție de tampon fosfat, 10...15 cicluri pe domeniul de potențial 0...0,9 V, incubarea electrodului la temperatura de 4°C cu un volum de 40 μl adiponectină cu concentrația de 50 μg/ml timp de 20 min, urmată de incubarea în apă deionizată timp de 16...18 h, rezultând un șablon sintetic selectiv pentru adiponectină "label free".

Revendicări: 1
Figuri: 8



58

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 2017 0 93
Data depozit 27-11-2017

PROCEDEU DE OBTINERE SABLON SELECTIV PENTRU DETECTIA ELECTROCHIMICA "LABEL FREE" A ADIPONECTINEI DIN PROBE BIOLOGICE UMANE

DESCRIERE INVENTIE

Inventia se refera la procedeul de obtinere a unor sabloane selective pentru detectia electrochimica "label free" a adiponectinei native umane, pe suprafata de aur policristalin care este folosita ca electrod de lucru a unei celule electrochimice formata din 3 electrozi: electrod de lucru, de referinta (vs Ag/AgCl) si contraelectrodul din platina.

Adiponectina este o proteina plasmatica care contine 244 de aminoacizi produsa in tesutul adipos si este implicata in metabolismul lipidic si glucidic. Nivelurile scazute serice de adiponectina duc la scaderea oxidarii acizilor grasi in ficat si muschii scheletici, prin urmare cauzand rezistenta la insulina [Armin Salek, 2018]. Prin urmare domeniul de aplicare este cel biomedical si anume laboratoare clinice, cabinete medicale sau camere de urgenta.

In prezent pentru determinarea adiponectinei se utilizeaza trusele ELISA care sunt metode consumatoare de timp, laborioase si care folosesc ca elemente de biorecunoastere anticorpii specifici pentru adiponectina dar si molecule de anticorpi folositi pentru detectie (nu sunt metode "label-free").

De asemenea se cunosc cateva metode in literatura bazate in special pe imobilizarea adiponectinei prin intermediul elementelor de biorecunoastere reprezentate de anticorpii biologici specifici dar nu se cunosc pentru adiponectina metode care sa contina elemente de recunoastere artificiale (sabioane) create prin tehnica imprimarii moleculare in filmul de polifenol. Se cunosc in literatura de specialitate biosenzori electrochimici recenti de tipul "point-of-care" in care s-a detectat adiponectina la nivel de picomolar [Brazaca et. Al 2016, Ojeda et. al. 2015] dar niciunul nu utilizeaza tehnica imprimarii adiponectinei in polifenol de pe suprafata de aur.

Functionalizarea bio-chimica a electrozilor de aur este procesul cheie de constructie a unui viitor senzor electrochimic. In functie de acest proces, suprafata electrozilor va fi capabila sa retina exclusiv proteina de interes, sa fie specifica iar metoda electrochimica aleasa sa fie capabila sa transforme interactia suprafetei cu adiponectina din proba intr-un semnal de curent sau potential.

Avantajul utilizării tehnicii imprimării moleculare în polimeri (MIP) în cazul proteinelor, constă în faptul că șablonul realizat după îndepărtarea fizică a proteinei prezintă o multitudine de situsuri de reacție complementare cu proteina din probă în comparație cu anticorpii biologici care au doar situsurile de legare din zona de legare cu antigenul (Fab).

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față, constă în aceea că suprafața funcționalizată chimic formează un șablon complementar (ca formă, dimensiune și grupe funcționale) complementare cu adiponectina care permite detectia cantitativă și directă a adiponectinei din probă biologică, fără a necesita un anticorp biologic (predispus la reacții încrucisate) și nici molecule folosite pentru detecție.

Șablonul selectiv pentru adiponectina realizat prin tehnica de imprimare moleculară în polimeri (MIP) prin electropolimerizarea fenolului și imprimarea moleculei native de adiponectina în filmul format face obiectul prezentei invenții. Cavitățile tridimensionale create în polimerul format pe aur, complementare ca dimensiune, formă și grupe funcționale cu adiponectina din probă de ser uman, permite determinarea selectivă a acesteia cu ajutorul metodelor electrochimice. Această procedură este extrem de importantă deoarece se obțin suprafețe de aur cu elemente de recunoaștere artificiale specifice și selective pentru adiponectina care pot fi utilizate în detectia electrochimică (*label free*) a adiponectinei din probe de ser uman. Formarea **șablonului**, presupune în general parcurgerea următoarelor etape:

curățarea electrozilor de aur și verificarea gradului de curățare prin metoda spectrometriei de impedanță electrochimică (EIS) și CV utilizând un mediator chimic;

baleierea pe domeniul de potențial 0-0,9 V în soluția de tampon fosfat PBS (pH=7,4) cu viteză de scanare de 50 mV și 100 mV pentru înregistrarea voltamogramelor înainte de electropolimerizare;

procesul de electropolimerizare a electrodului cu 2 mM de fenol în soluție tampon fosfat PBS (pH=7,4) pe domeniul de potențial 0-0,9 V, 10-15 cicluri;

incubarea electrodului, timp de 20 minute la 4°C cu un volum de 40 μL de adiponectina cu concentrația de 50 μg/mL în apă deionizată;

repetarea etapei 1.3 pentru incorporarea fizică a proteinei în stratul de polimer;
formarea finală a șablonului pentru reacția cu adiponectina – prin incubarea în apă deionizată timp de 16-18 ore;

Pentru aplicatie, sablonul este incubat progresiv in concentratii cunoscute de adiponectina introduse in serul uman dupa care se verifica electrochimic modificarea rezistentei la transferul electronic (in solutia electrolit: tampon fosfat cu pH=7,4 impreuna cu mediatori chimici) dupa fiecare concentratie adaugata si incubata cu sablonul.

Concentratiile cunoscute de adiponectina au fost introduse in ser uman de control si au fost urmatoarele: 0 ng/mL (I); 0,1 ng/mL(II); 1ng/mL (III);10ng/mL(IV); 100ng/mL(V); 1000 ng/mL(VI); 10000 ng/mL (VII); citirea se realizeaza utilizand softul VoltaLab PGZ 100 cu auto RC *Fitting* dupa fiecare etapa de incubare si incorporare electrochimica a concentratiilor progressive de adiponectina in polimer.

Molecula de adiponectina este adsorbita prin adsorbție fizica si prin interactii hidrofobice intre aceasta si suprafata electropolimerizata. Imersarea suprafetei in apa peste noapte (>18h) desface legaturile fizice prin care adiponectina este tinuta pe suprafata aurului lasand in urma situsuri, grupari functionale si forma caracteristica numai adiponectinei.

Avantajele sabloanelor sintetice comparativ cu cele care utilizeaza anticorpii biologici sunt: reducerea legaturilor nespecifice, a reactiilor incrucisate; selectivitate ; electropolimerizarea realizeaza o acoperire omogena a suprafetei de aur; mai multe situsuri de legare cu proteina din proba de ser uman;se pot utiliza pentru detectia electrochimica fara molecule de detectie- "label free".

Se da, in continuare, exemplul de realizare a procedului de formare a sablonului conform inventiei, in legatura cu figurile care reprezinta:

Fig. 1. Celula electrochimica cu cei 3 electrozi conectati la potentiostat VoltaLab PGZ 100: A. electrod de lucru –suprafata de aur policristalin ; B. electrodul de referinta Ag/AgCl in KCl si C. electrodul de platina – contraelectrodul.

Fig. 2. Verificare EIS (plotare Nyquist) si CV a etapelor de curatare a suprafetei de aur in solutie de tampon fosfat (pH=7, 4) cu 5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ si 5mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$: A. Voltamograma ciclica a electrodului de aur curatat cu raportul curentilor de pic ≈ 1 . B. Plotari Nyquist (-Zi vs Zr) a electrodului de aur dupa curatare in solutia electrolit de tampon fosfat (pH=7, 4) cu 5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ si 5mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, domeniu frecvente 50 kHz- 1 Hz;

Fig. 3. Voltamograme ciclice: A. inainte de electropolimerizare; B. in timpul depunerii filmului de polifenol si C. dupa formarea filmului de polifenol (realizata in solutie de 2mM fenol in PBS, pH=7, 4, viteza scanare 50mV/s, 10 cicluri).

Fig. 4. Plotari Nyquist (-Zi vs Zr) a electrodului de aur dupa formarea filmului de polifenoli; solutie electrolit tampon fosfat (pH=7,4) cu 5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ si 5mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, domeniu frecvente 50kHz- 1Hz;

Fig. 5 Voltamograme ciclice A. dupa incorporare adiponectina in filmul de polifenol; B. dupa spalare cu apa si formare sablon pentru detectie adiponectina din probe de ser uman;

Fig. 6 Plotari Nyquist (-Zi vs Zr) A. dupa incorporare adiponectina in filmul de polifenol; B. dupa spalare si formare sablon;

Fig. 7 Plotari Nyquist (-Zi vs zr) utilizand *RC Fitting* (VoltaLab PGZ 100) dupa incubari ale sablonului cu concentratii progresive de adiponectina in ser uman (verificare in solutia electrolit de tampon fosfat (pH=7,4) cu 5mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ si 5mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$, domeniu frecvente 1kHz- 100 mHz) astfel: I. (0ng/mL); II. (0,1ng/mL); III. (1ng/mL); IV (10ng/mL); V(100ng/mL); VI (1000ng/mL); VII (10000 ng/mL).

Fig. 8 Curba calibrare in functie de concentratia de adiponectina ($R^2=0,993$); cresterea logaritmica a concentratiei adiponectinei este direct proportionala cu raportul dintre, rezistenta de transfer la suprafata electrodului dupa adaugarea concentratiei si rezistenta sablonului (incubat cu serul uman fara adiponectina), rezistente masurate cu ajutorul unor mediatori chimici (raport $R_{CT}(C_i)/R_{CT}(C_0)$).

Exemplu:

curatarea electrochimica a suprafetelor prin imersia lor in apa, izopropanol, etanol cate 10 minute si uscare la azot;

verificarea comportarii electrochimice a suprafetei curatate prin inregistrarea voltamogramelor ciclice dupa baleierea potentialului intre (0 si - 600mV) apoi intre (0 si 800 mV) cate 5 cicluri fiecare in solutie de PBS ce contine un amestec de mediatori chimici 5mM Fe (CN)₆⁴⁻ si 5mM de Fe (CN)₆³⁻;

inregistrarea spectrelor CV si EIS dupa curatare: obtinerea voltamogramei caracteristice aurului curatat pe domeniul de potential -50mV -900 mV in solutie de PBS ce contine un amestec de mediatori chimici 5mM Fe (CN)₆⁴⁻ si 5mM de Fe (CN)₆³⁻ si spalare cu tampon fosfat (7,4);

electropolimerizarea suprafetei electrodului de aur policristalin cu 2 mM de fenol in solutie tampon fosfat (pH=7, 4) pe domeniul de baleiaj al potentialului intre 0 si 0, 9 V cu viteza de scanare 50mV/s; verificare electrochimica suprafata cu mediatori chimici in PBS cu pH=7,4;

incubarea electrodului cu 50 µg/mL adiponectina aflata in solutie cu pH =7 la temperatura de 4 ° C timp de 20 de minute si caracterizare electrochimica dupa incubare in solutie de 3;

repetare etapa 1 si inregistrare EIS si CV in solutie cu PBS= 7,4 si amestec de mediatori chimici 5mM Fe (CN)₆⁴⁻ si 5mM de Fe (CN)₆³⁻

imersarea suprafetei in apa peste noapte (>18h) duce la obtinerea sablonului

caracterizarea electrochimica dupa formarea sablonului (CV si EIS)

incubarea sablonului 30 minute sub agitare la temperatura camerei, cu cate 50 µL de concentratii cunoscute (introduse in serul uman normal de control) progresive si seriale de adiponectina de la 0 la 10000 ng/mL;

verificarea electrochimica prin EIS dupa incubarea cu fiecare concentratie;

inregistrare spectre Nyquist Plot (-Z_i vs Z_r) dupa fiecare concentratie;

construirea curbei de calibrare pentru detectie adiponectina in ser uman de control.

REVENDICARI

1. Revendicarea se refera la procedeul prin care se realizeaza un sablon selectiv pentru detectia electrochimica "label free" a adiponectinei native umane din serul uman, **sablon caracterizat prin aceea ca se realizeaza astfel: curatarea electrochimica a suprafetelor imersia lor in apa, izopropanol, etanol cate 10 minute si uscare la azot apoi verificarea comportarii electrochimice a suprafetei curatate prin inregistrarea CV dupa baleierea potentialului intre (0 si - 600mV) apoi intre (0 si 700 mV) cate 5 cicluri fiecare in solutie de PBS ce contine un amestec de mediatori chimici 5mM Fe (CN)₆⁴⁻ si 5mM de Fe (CN)₆³⁻ urmata de obtinerea voltamogramei caracteristice aurului curatat pe domeniul de potential -700mV - 700mV si inregistrarea spectrelor CV si EIS dupa curatare apoi spalare cu tampon fosfat (7,4) in continuare are loc electropolimerizarea suprafetei electrodului de aur policristalin cu 2 mM de fenol in solutie tampon fosfat (pH=7,4) pe domeniul de baleiaj al potentialului intre 0 si 0,9 V cu viteza de scanare 50mV/s urmeaza verificarea electrochimica a suprafetei cu mediatori chimici in PBS 7,4 dupa care are loc incubarea electrodului cu 50 µg/mL adiponectina aflata in solutie cu pH =7 la temperatura de 40°C timp de 20 de minute si apoi caracterizarea electrochimica dupa incubare si apoi se repeta etapa 1 dupa care se inregistreaza EIS si CV apoi imersarea suprafetei in apa peste noapte (>18h) care in final duce la obtinerea sablonului care se caracterizeaza prin impedanta si voltametrie ciclica de baleiaj si apoi folosirea lui prin incubarea timp de 30 minute sub agitare la temperatura camerei, cu cate 50 µL de concentratii cunoscute (introduse in serul uman normal de control) progresive si seriale de adiponectina de la 0 la 10000ng/mL urmata de verificarea electrochimica prin EIS dupa incubarea cu fiecare concentratie si inregistrare spectre Nyquist Plot (-Z_i vs Z_r) dupa fiecare concentratie si apoi se construiesc curba de calibrare, raportand rezistenta la transferul electronic (obtinuta din plotarile EIS Nyquist) a sablonului incubat numai cu serul de control uman fara adiponectina si rezistenta la transferul electronic al sablonului incubat cu concentratii cunoscute de adiponectina adaugate in ser ((raport R_{CT} (C_i)/ R_{CT} (C₀)).**

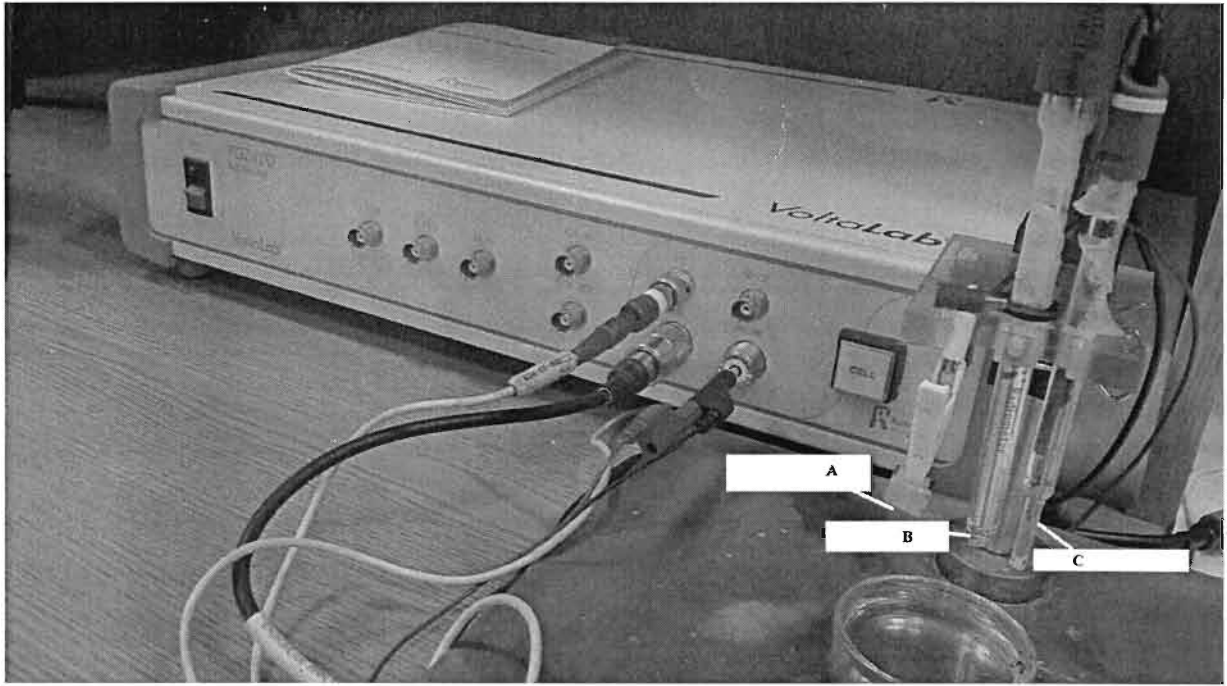


Fig.1

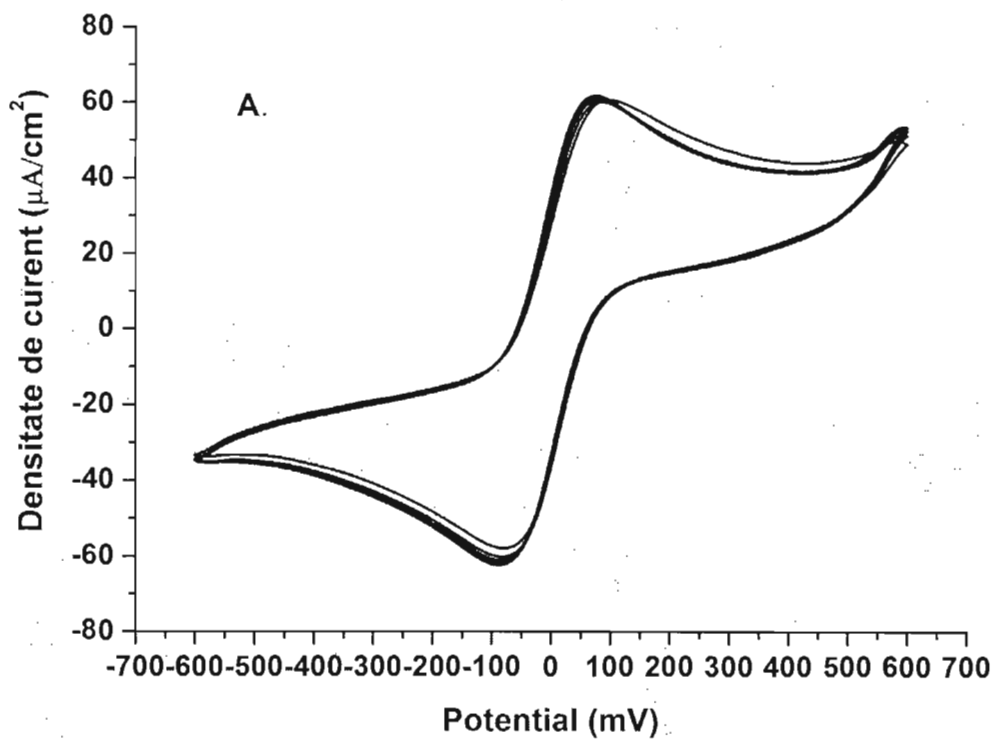


Fig.2A

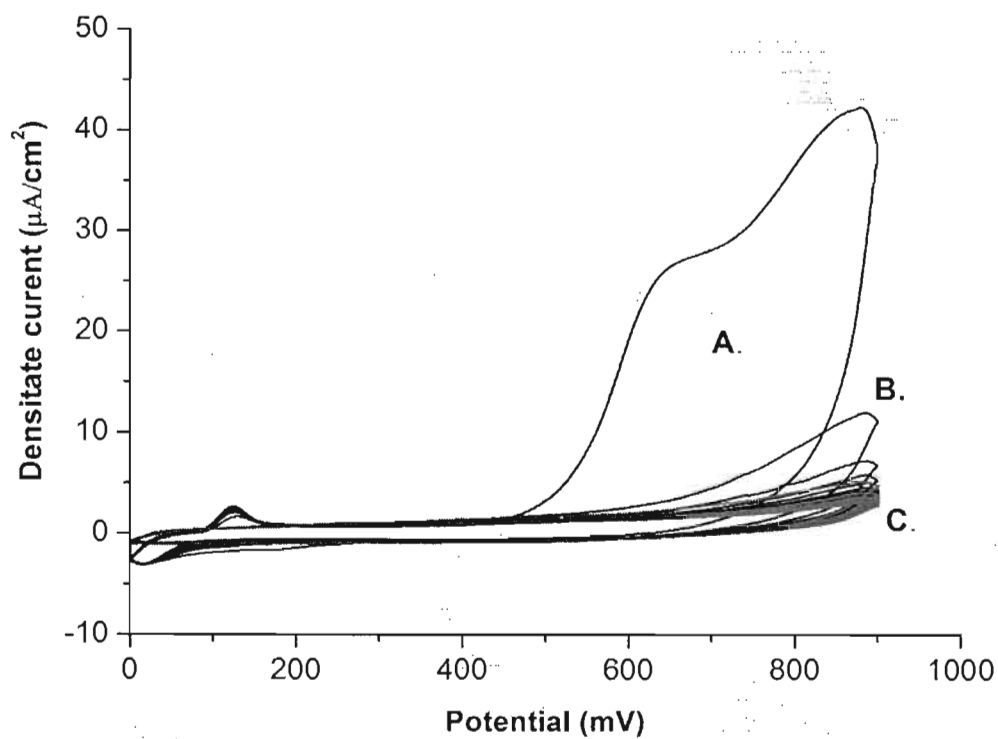


Fig.2B

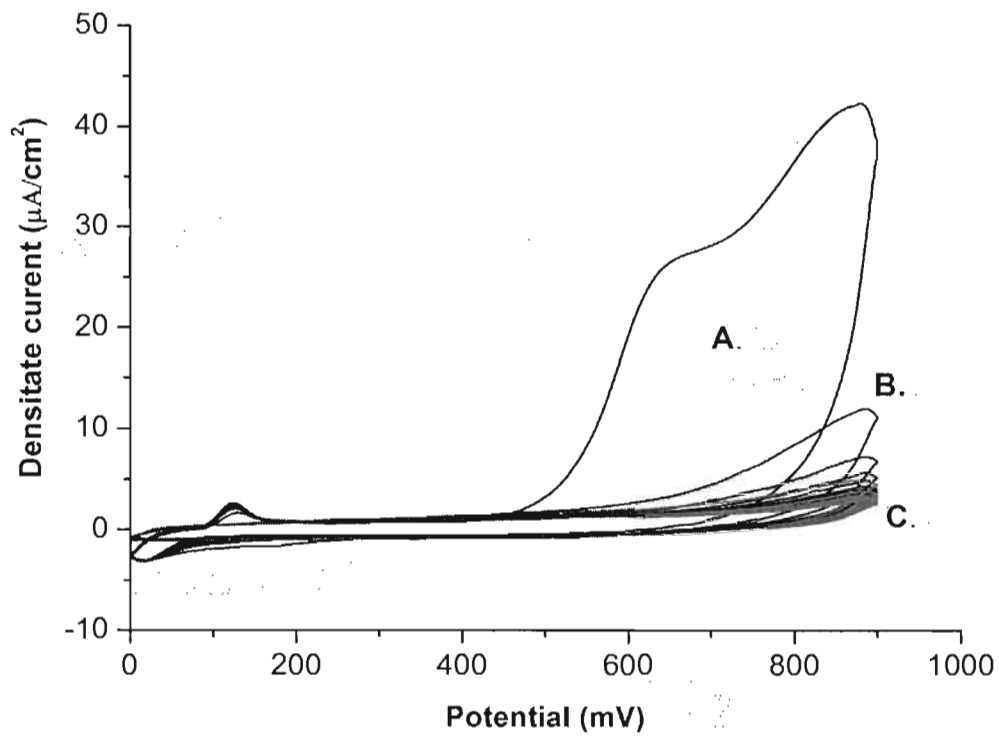


Fig.3

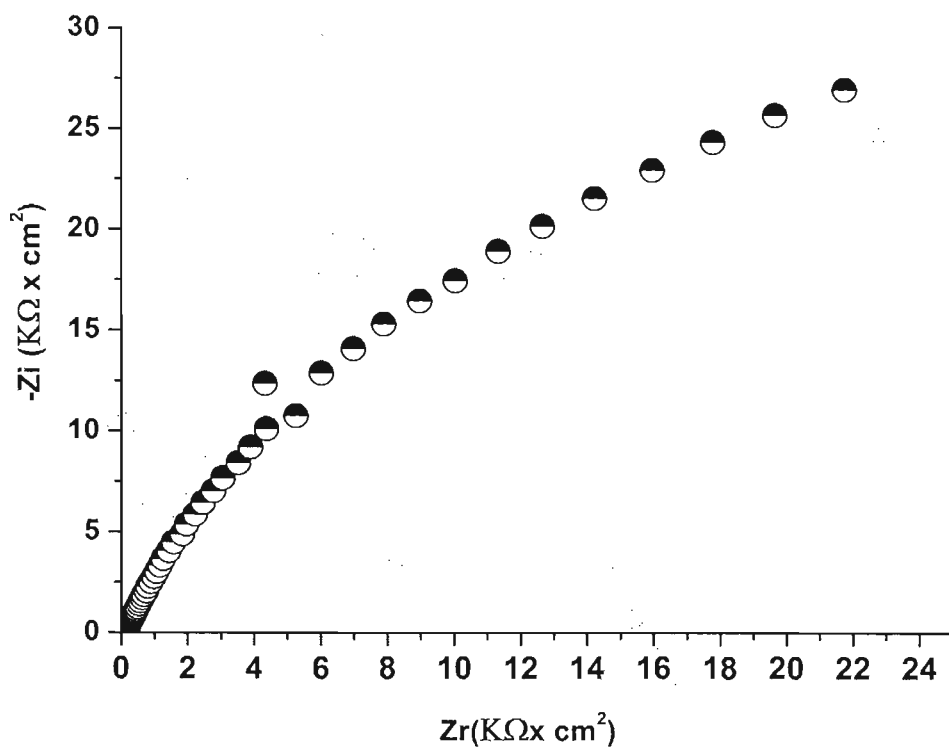


Fig.4

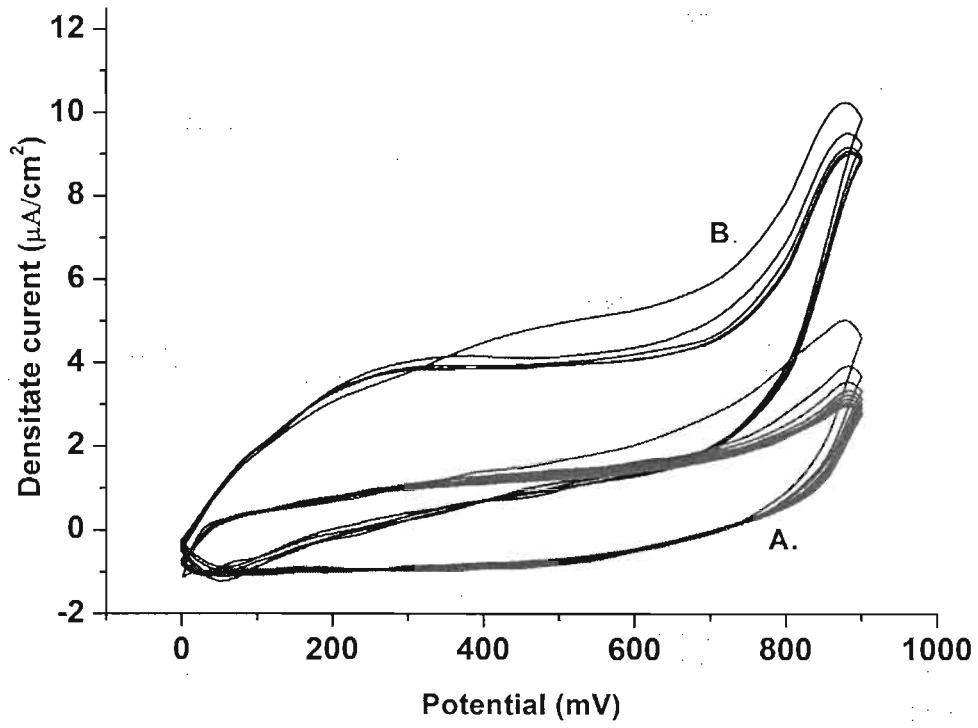


Fig.5

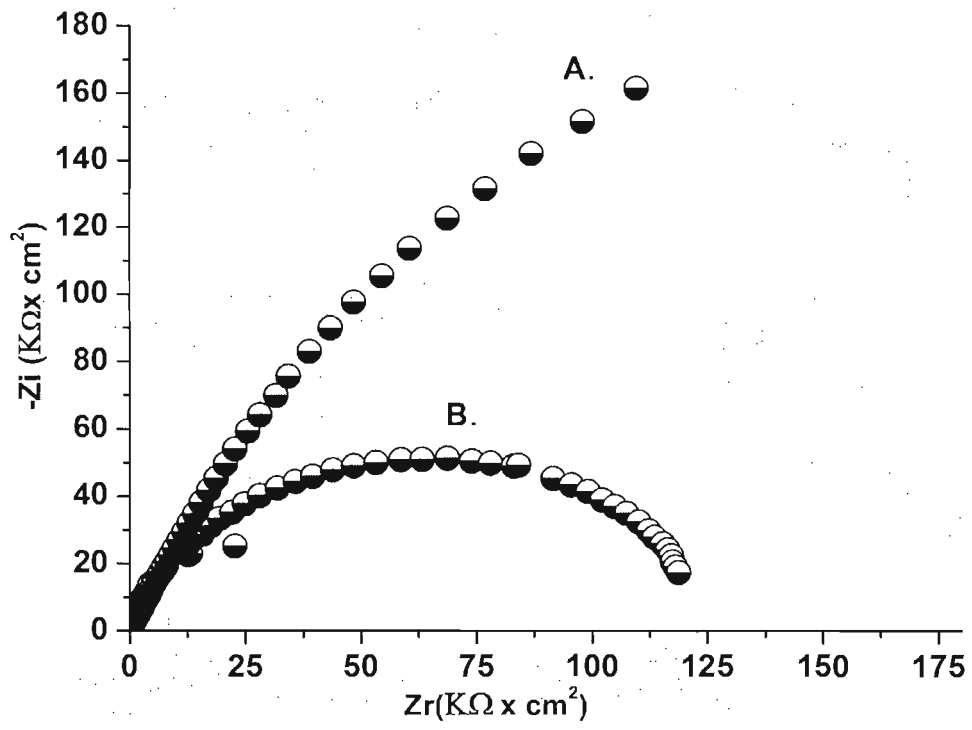


Fig.6

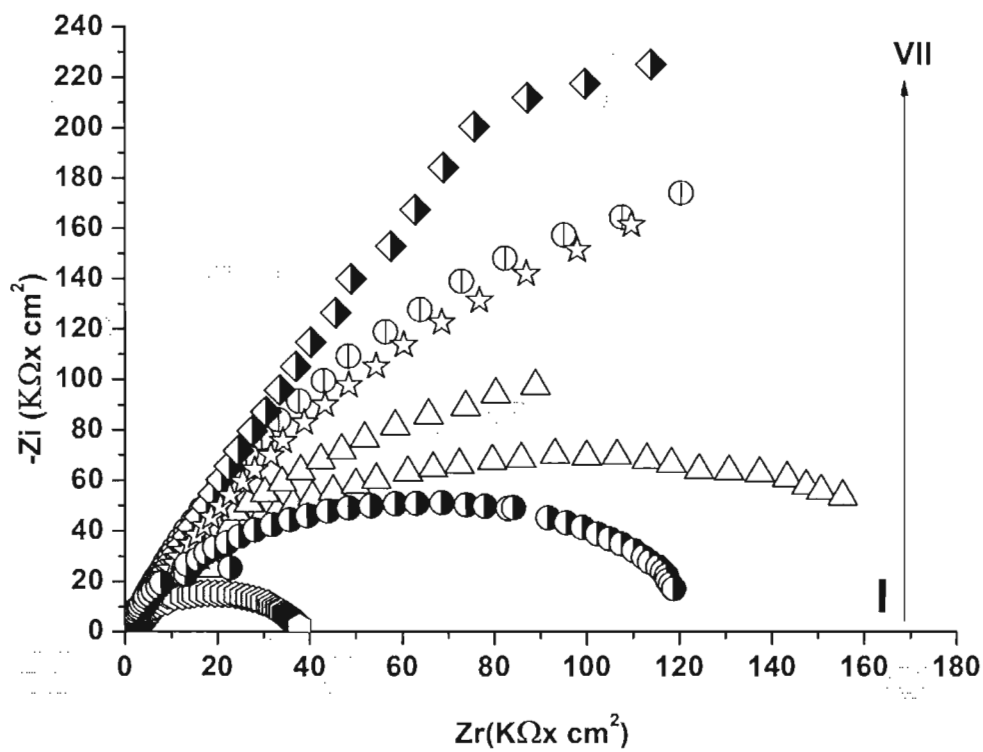


Fig.7

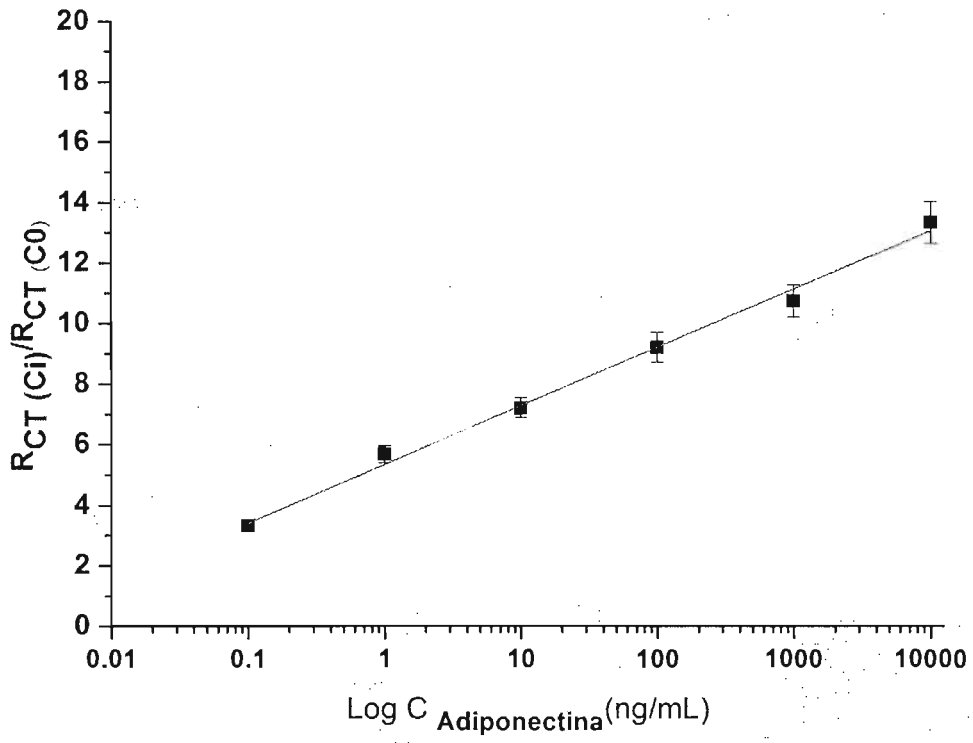


Fig.8