



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00983**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2022** BOPI nr. **2/2022**

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

(73) Titular:
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 101571546 (A); US 2007042424 (A)

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



RO 132771 B1

1 Invenția se referă la procedeul de obținere a unor șabloane selective pentru detecția electrochimică a adiponectinei din probe biologice umane.

3 Adiponectina este o proteină plasmatică care conține 244 de aminoacizi, este produsă în țesutul adipos și este implicată în metabolismul lipidic și glucidic. Nivelurile scăzute
5 serice de adiponectina duc la scăderea oxidării acizilor grași în ficat și mușchii scheletici, prin
7 urmare cauzând rezistența la insulină [Armin Salek, 2018]. Prin urmare domeniul de aplicare
este cel biomedical și anume laboratoare clinice, cabinete medicale sau camere de urgență.

9 În prezent pentru determinarea adiponectinei se utilizează trusele ELISA care sunt
11 metode consumatoare de timp, laborioase și care folosesc ca elemente de biorecunoaștere
anticorpii specifici pentru adiponectină dar și molecule de anticorpi folosiți pentru detecție (nu
sunt metode "label-free").

13 De asemenea se cunosc câteva metode în literatură bazate în special pe imobilizarea
adiponectinei prin intermediul elementelor de biorecunoaștere reprezentate de anticorpii
15 biologici specifici dar nu se cunosc pentru adiponectină metode care să conțină elemente
de recunoaștere artificiale (șabloane) create prin tehnica imprimării moleculare în filmul de
17 polifenol. Se cunosc în literatura de specialitate biosenzori recenți de tipul "point-of-care" în
care s-a detectat adiponectina la nivel de picomolar [Brazaca et. Al 2016, Ojeda et. al.
19 2015] dar niciunul nu utilizează tehnica imprimării adiponectinei în polifenol depus pe
suprafața de aur.

21 Funcționalizarea bio-chimică a electrozilor de aur este procesul cheie de construcție
a unui viitor senzor electrochimic. În funcție de acest proces, suprafața electrozilor va fi
23 capabilă să rețină exclusiv proteina de interes, să fie specifică iar metoda electrochimică
aleasă să fie capabilă să transforme interacția suprafeței cu adiponectina din probă într-un
semnal de curent sau potențial.

25 Avantajul utilizării tehnicii imprimării moleculare în polimeri (MIP) în cazul proteinelor,
constă în faptul că șablonul realizat după îndepărtarea fizică a proteinei prezintă o
27 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).

29 Șablonul selectiv pentru adiponectină realizat prin tehnica de imprimare moleculară
în polimeri (MIP) prin electropolimerizarea fenolului și imprimarea moleculei native de
31 adiponectină în filmul format face obiectul prezentei invenții. Cavitățile tridimensionale create
în polimerul format pe aur, complementare ca dimensiune, formă și grupe funcționale cu
33 adiponectina din proba de ser uman, permite determinarea selectivă a acesteia cu ajutorul
metodelor electrochimice. Această procedură este extrem de importantă deoarece se obțin
35 suprafețe de aur cu elemente de recunoaștere artificiale specifice și selective pentru
adiponectina care pot fi utilizate în detecția electrochimică (label free) a adiponectinei din
37 probe de ser uman. Suprafața funcționalizată chimic formează un șablon complementar (ca
formă, dimensiune și grupe funcționale) complementare cu adiponectina care permite
39 detecția cantitativă și directă a adiponectinei din proba biologică, fără a necesita un anticorp
biologic (predispus la reacții încrucișate) și nici molecule folosite pentru detecție.

41 Problema tehnică pe care o rezolvă invenția, o reprezintă obținerea unor șabloane
selective pentru detecția adiponectinei fără a necesita molecule și anticorpi biologici.

43 Procedeul de obținere a unor șabloane selective pentru detecția electrochimică a
adiponectinei din probe biologice umane presupune în general parcurgerea următoarelor
45 etape:

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

RO 132771 B1

- baieirea pe domeniul de potențial 0...0,9 V în soluția de tampon fosfat PBS (pH = 7,4) cu viteza de scanare de 50...100 mV pentru înregistrarea voltamogramelor înainte de electropolimerizare; 1
 - 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; 3
 - incubarea electrodului, timp de 20 min la 4°C cu un volum de 40 μl de adiponectină cu concentrația de 50 μg/ml în apă deionizată; 5
 - repetarea etapei 1 pentru încorporarea fizică a proteinei în stratul de polimer; 7
 - formarea finală a șablonului pentru reacția cu adiponectina - prin incubarea în apă deionizată timp de 16...18 h. 9
- Pentru aplicație, șablonul este incubat progresiv în concentrații cunoscute de adiponectină introduse în serul uman după care se verifică electrochimic modificarea rezistenței la transferul electronic (în soluția electrolit: tampon fosfat cu pH = 7,4 împreună cu mediatori chimici) după fiecare concentrație adăugată și incubată cu șablonul. 11
- Concentrațiile cunoscute de adiponectină au fost introduse în ser uman de control și au fost următoarele: 0 ng/mL (I); 0,1 ng/mL (II); 1 ng/mL (III); 10 ng/mL (IV); 100 ng/mL (V); 1000 ng/mL (VI); 10000 ng/mL (VII); citirea se realizează utilizând softul VoltaLab PGZ 100 cu auto RC Fitting după fiecare etapă de incubare și încorporare electrochimică a concentrațiilor progressive de adiponectină în polimer. 13
- Molecula de adiponectină este adsorbită prin adsorbție fizică și prin interacții hidrofobice între aceasta și suprafața electropolimerizată. Imersarea suprafeței în apă peste noapte (> 18 h) desface legăturile fizice prin care adiponectina este ținută pe suprafața auru- lui lăsând în urmă situsuri, grupări funcționale și forma caracteristică numai adiponectinei. 15
- Avantajele șabloanelor sintetice comparativ cu cele care utilizează anticorpii biologici sunt: reducerea legăturilor nespecifice, a reacțiilor încrucișate; selectivitate; electropolimerizarea realizează o acoperire omogenă a suprafeței de aur; mai multe situsuri de legare cu proteina din proba de ser uman; se pot utiliza pentru detecția electrochimică fără molecule de detecție - "label free". 17
- Se dă, în continuare, exemplul de realizare a procedurii de formare a șablonului conform invenției, în legătură cu fig. 1...8 care reprezintă: 19
- fig. 1, celula electrochimică cu cei 3 electrozi conectați la potentiostat VoltaLab PGZ 100: A. electrod de lucru - suprafața de aur policristalin; B. electrodul de referință Ag/AgCl în KCl și C. electrodul de platină - contraelectrodul; 21
 - fig. 2, verificare EIS (plotare Nyquist) și CV a etapelor de curățare a suprafeței de aur în soluție de tampon fosfat (pH = 7, 4) cu 5mM Fe (CN)₆⁴⁻ și 5mM de Fe (CN)₆³⁻: A. Voltamograma ciclică a electrodului de aur curățat cu raportul curenților de pic ≈ 1. B. Plotari Nyquist (-Zi vs Zr) a electrodului de aur după curățare în soluția electrolit de tampon fosfat (pH = 7,4) cu 5mM Fe (CN)₆⁴⁻ și 5mM de Fe (CN)₆³⁻, domeniu frecvențe 50 kHz-1 Hz; 23
 - fig. 3, voltamograme ciclice: A. înainte de electropolimerizare; B. în timpul depunerii filmului de polifenol și C. după formarea filmului de polifenol (realizată în soluție de 2 mM fenol în PBS, pH = 7, 4, viteza scanare 50 mV/s, 10 cicluri); 25
 - fig. 4, plotari Nyquist (-Zi vs Zr) a electrodului de aur după formarea filmului de polifenoli; soluție electrolit tampon fosfat (pH = 7,4) cu 5 mM Fe (CN)₆⁴⁻ și 5 mM de Fe (CN)₆³⁻, domeniu frecvențe 50 kHz-1 Hz; 27
 - fig. 5, voltamograme ciclice A. după încorporare adiponectina în filmul de polifenol; B. după spălare cu apă și formare șablon pentru detecție adiponectina din probe de ser uman; 29

RO 132771 B1

- 1 - fig. 6 Plotari Nyquist (-Zi vs Zr) A. după încorporare adiponectina în filmul de
polifenol; B. după spălare și formare șablon;
- 3 - fig. 7, plotari Nyquist (-Zi vs zr) utilizând RC Fiiting (VoltaLab PGZ 100) după
incubări ale șablonului cu concentrații progresive de adiponectină în ser uman (verificare în
5 soluția electrolit de tampon fosfat ($pH = 7,4$) cu 5 mM $Fe(CN)_6^{4-}$ și 5 mM de $Fe(CN)_6^{3-}$,
domeniu frecvențe 1 kHz-100 mHz) astfel: I. (0 ng/mL); II. (0,1 ng/mL); III. (1 ng/mL); IV
7 (10 ng/mL); V(100 ng/mL); VI (1000 ng/mL); VII (10000 ng/mL);
- 9 - fig. 8, curba calibrare în funcție de concentrația de adiponectină ($R^2 = 0,993$);
creșterea logaritmică a concentrației adiponectinei este direct proporțională cu raportul
dintre, rezistența de transfer la suprafața electrodului după adăugarea concentrației și
11 rezistența șablonului (incubat cu serul uman fără adiponectină), rezistențe măsurate cu
ajutorul unor mediatori chimici (raport $R_{CT}(C_i)/R_{CT}(C_0)$).
- 13 **Exemplu**
- 15 - curățarea electrochimică a suprafețelor prin imersia lor în apă, izopropanol, etanol
câte 10 min și uscare la azot;
- 17 - verificarea comportării electrochimice a suprafeței curățate prin înregistrarea volta-
mogramelor ciclice după baleierea potențialului între (0...600 mV) apoi între (0...800 mV)
câte 5 cicluri fiecare în soluție de PBS ce conține un amestec de mediatori chimici 5 mM $Fe(CN)_6^{4-}$ și 5 mM de $Fe(CN)_6^{3-}$;
- 19 - înregistrarea spectrelor CV și EIS după curățare: obținerea voltamogramei carac-
21 teristice aurului curățat pe domeniul de potențial - 50 mV - 900 mV în soluție de PBS ce
conține un amestec de mediatori chimici 5 mM $Fe(CN)_6^{4-}$ și 5 mM de $Fe(CN)_6^{3-}$ și spălare
23 cu tampon fosfat la un $pH = 7,4$;
- 25 - electropolimerizarea suprafeței electrodului de aur policristalin cu 2 mM de fenol în
soluție (tampon fosfat ($pH = 7, 4$) pe domeniul de baleiaj al potențialului între 0 și 0,9 V cu
viteza de scanare 50 mV/s; verificare electrochimică suprafața cu mediatori chimici în PBS
27 cu $pH = 7,4$;
- 29 - incubarea electrodului cu 50 $\mu g/ml$ adiponectina aflată în soluție cu $pH = 7$ la
temperatura de 4°C timp de 20 min și caracterizare electrochimică după incubare în soluție
de 3;
- 31 - repetare etapa 1 și înregistrare EIS și CV în soluție cu PBS = 7,4 și amestec de
mediatori chimici 5 mM $Fe(CN)_6^{4-}$ și 5 mM de $Fe(CN)_6^{3-}$;
- 33 - imersarea suprafeței în apă peste noapte (> 18 h) duce la obținerea șablonului
caracterizarea electrochimică după formarea șablonului (CV și EIS);
- 35 - incubarea șablonului 30 min sub agitare la temperatura camerei, cu câte 50 μl de
concentrații cunoscute (introduse în serul uman normal de control) progresive și seriale de
37 adiponectină de la 0 la 10000 ng/mL;
- 39 - verificarea electrochimică prin EIS după incubarea cu fiecare concentrație;
- înregistrare spectre Nyquist Plot (-Zi vs Zr) după fiecare concentrație;
- construirea curbei de calibrare pentru detecție adiponectină în ser uman de control.

RO 132771 B1

Revendicare

	1
Procedeu de obținere a unor șabloane selective pentru detecția electrochimică a adiponectinei din probe biologice umane, caracterizat prin aceea că , cuprinde următoarele etape:	3
	5
- curățarea electrozilor de aur prin imersia lor în apă, izopropanol, etanol câte 10 min și uscare la azot și verificarea gradului de curățare prin metoda spectrometriei de impedanță electrochimică utilizând un mediator chimic;	7
- baleierea pe domeniul de potențial 0...600 mV apoi 0...700 mV câte 5 cicluri fiecare în soluție de tampon fosfat care conține un amestec de mediatori chimici 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ și 5 mM de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ pentru înregistrarea voltamogramelor înainte de electropolimerizare și înregistrarea spectrelor după curățare apoi spălare cu tampon fosfat la un pH=7,4;	9
- procesul de electropolimerizare a electrodului de aur policristalin cu 2 mM de fenol în soluție tampon fosfat la un pH = 7,4 pe domeniul de potențial 0...0,9 V, cu viteza de scanare de 50 mV/s și verificarea electrochimică a suprafeței cu mediatori chimici în soluție tampon fosfat la un pH = 7,4;	13
- incubarea electrodului cu 50 μg/ml adiponectină aflată în soluție cu un pH = 7, la temperatura de 4°C timp de 20 min;	17
- repetarea etapei 1 pentru încorporarea fizică a proteinei în stratul de polimer și imersarea suprafeței în apă peste noapte timp de 18 h;	19
- formarea finală a șablonului pentru reacția cu adiponectina - prin incubarea în apă deionizată timp de 16...18 h;	21

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

G01N 27/30 (2006.01);

G01N 27/48 (2006.01);

C23C 18/42 (2006.01)

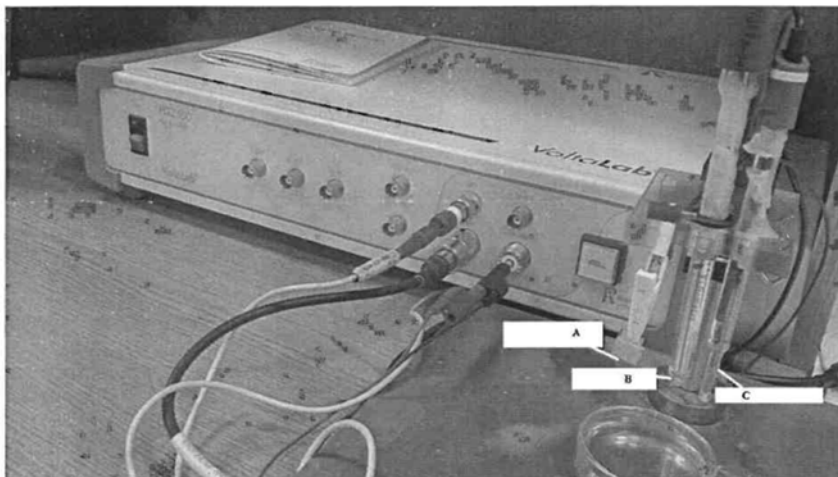


Fig. 1

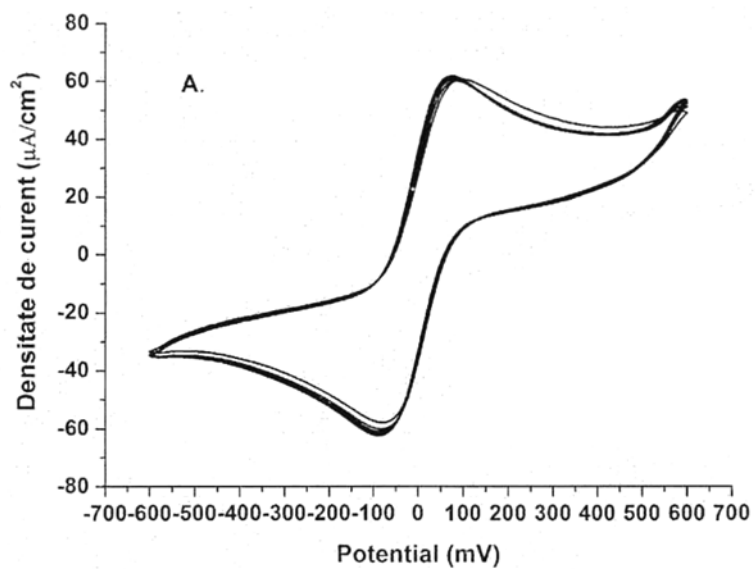


Fig. 2A

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

G01N 27/30 (2006.01);

G01N 27/48 (2006.01);

C23C 18/42 (2006.01)

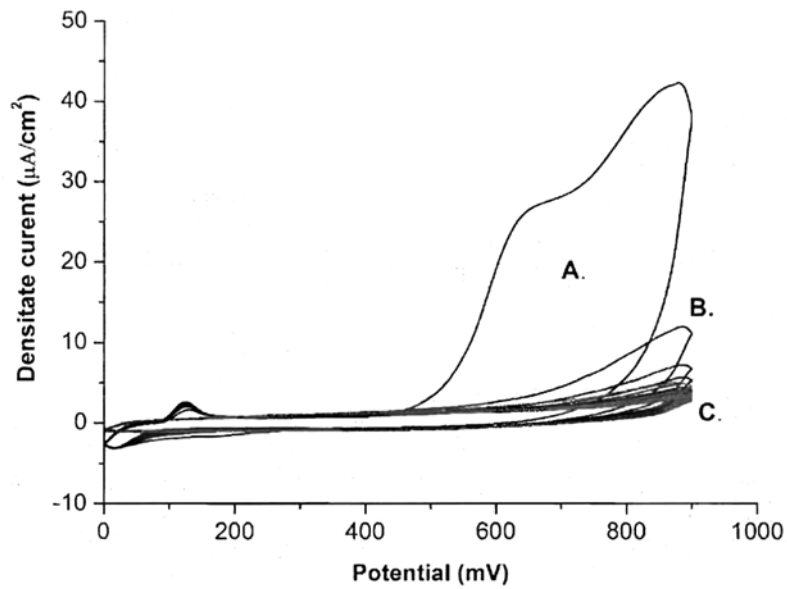


Fig. 2B

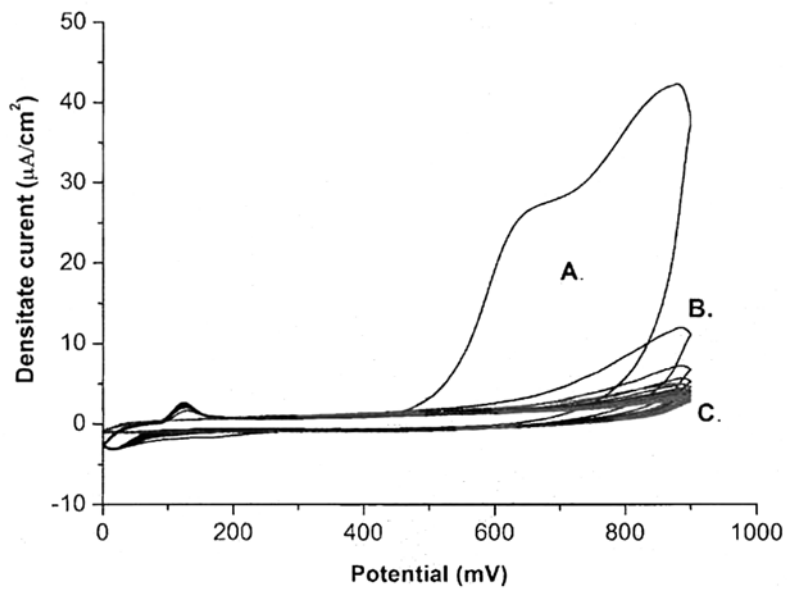


Fig. 3

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

G01N 27/30 (2006.01);

G01N 27/48 (2006.01);

C23C 18/42 (2006.01)

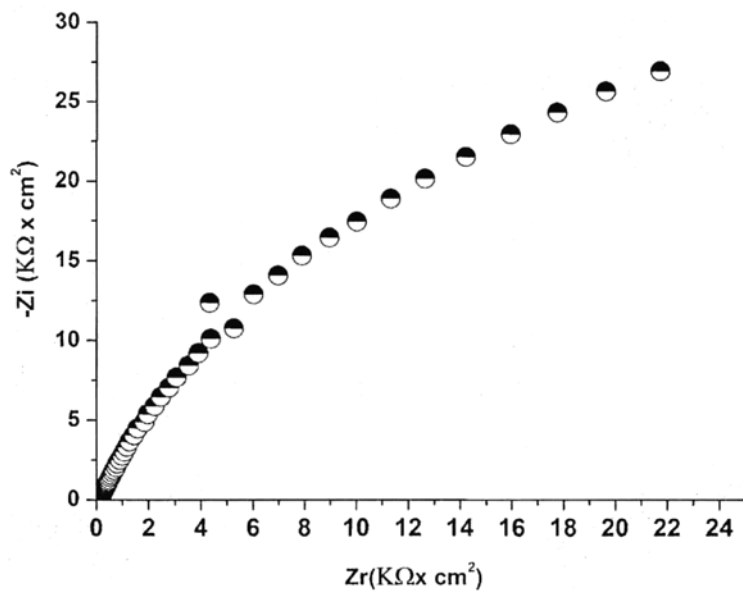


Fig. 4

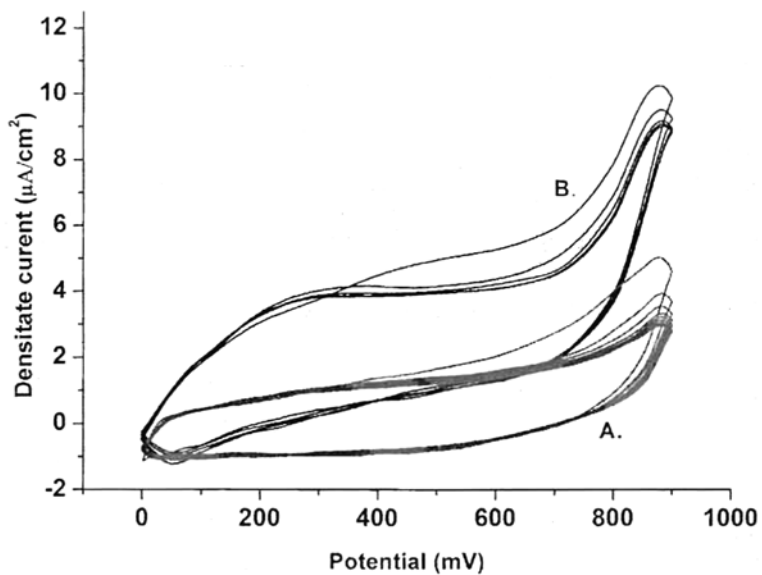


Fig. 5

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);
G01N 27/30 (2006.01);
G01N 27/48 (2006.01);
C23C 18/42 (2006.01)

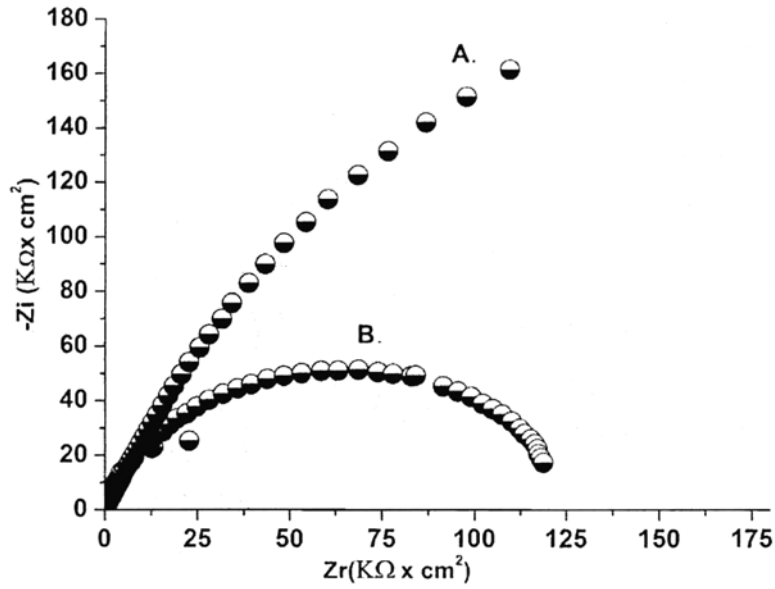


Fig. 6

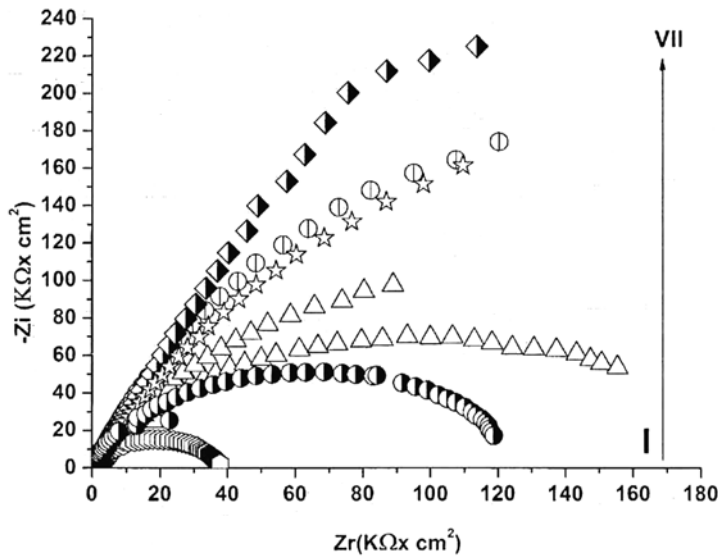


Fig. 7

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01);

G01N 27/30 (2006.01);

G01N 27/48 (2006.01);

C23C 18/42 (2006.01)

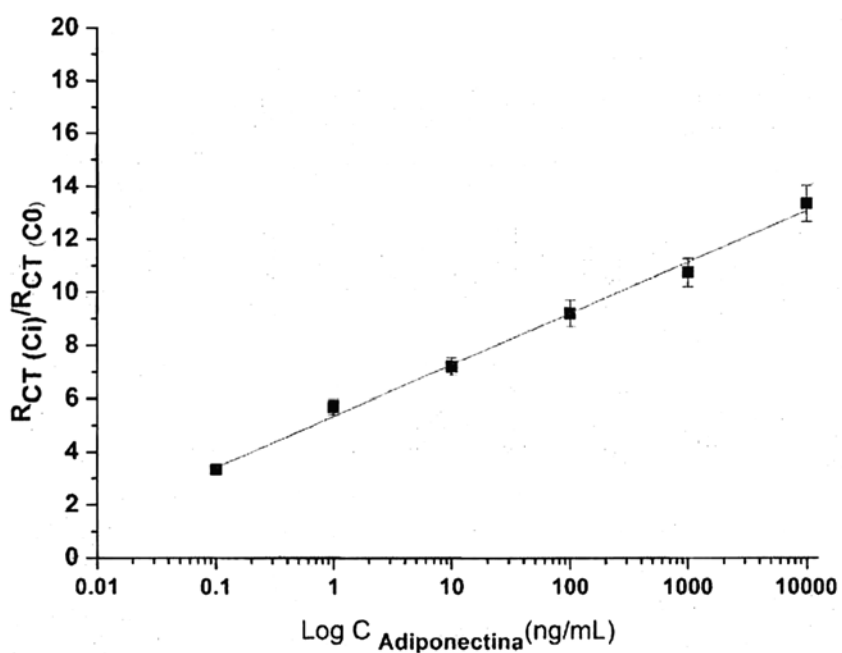


Fig. 8



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 74/2022