



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2018 00572

(22) Data de depozit: 08/08/2018

(41) Data publicării cererii:
28/02/2020 BOPI nr. 2/2020

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

(72) Inventatori:
• STAN DANA, STR. SEGOVIA NR. 1,
BL. C8, SC. 3, AP. 39, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• MIHAILESCU CARMEN MARINELA,
STR.ARMASUL MARCU NR.11, BL.24,
SC.1, ET.7, AP.48, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• RADULESCU CLARA HORTENSIA,
STR.CONSTANTIN BRÂNCUȘI NR.11,
BL.D16, SC.4, ET.9, AP.159, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE FUNCȚIONALIZARE ELECTROCHIMICĂ
A UNOR ELECTROZI INTERDIGITAȚI PENTRU DETECȚIA
ANTIGENULUI RECEPTOR DE SUPRAFAȚĂ CD4+
AL SUBPOPULAȚIILOR DE LIMFOCITE T-CD4+**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor bioreceptori specifici pentru detecția antigenului receptor de suprafață CD4+ al subpopulațiilor de limfocite T CD+. Procedeu, conform invenției, constă în funcționalizarea electro-chimică a 10 electrozi interdigitați de aur prin curățarea electrochimică prin tehnica voltametriei ciclice de baleiaj linear, imersarea în soluție de tioli micști în etanol absolut, rezultând un monostrat autoasamblat mixt pe suprafețele electrozilor, imersarea într-o soluție amestec pentru activarea grupărilor hidroxil, pentru reacția cu grupările amino din proteina

G formând legături amidice, blocarea site-urilor nereactive cu proteina de blocare Albumină Serică Bovină, și incubarea fiecărui electrod interdigitat, pe care este imobilizată proteina G, cu anticorpii specifici pentru antigenul CD4+, rezultând bioreceptori utilizați ca senzori electrochimici interdigitați pentru detecția antigenului CD4+.

Revendicări: 1
Figuri: 6





**PROCEDEU DE FUNCTIONALIZARE ELECTROCHIMICA A UNOR
ELECTROZI INTERDIGITATI PENTRU DETECTIA ANTIGENULUI
RECEPTOR DE SUPRAFATA CD4+ AL SUBPOPULATIILOR DE
LIMFOCITE T - CD4+**

DESCRIERE INVENTIE

Inventia se refera la procedeul de functionalizare electrochimica a unor electrozi interdigitati de aur pentru detectia electrochimica, "label free", a antigenului CD4+. Electrozii sunt tratati chimic astfel incat sa permita atasarea anticorpilor specifici anti CD4+ pe suprafata lor. Se formeaza astfel bioreceptori care pot lega antigenul CD4+ din proba biologica. Suprafetele interdigitate de aur intra in componenta unui dispozitiv de tip sensor electrochimic si au rolul de electrod de lucru al unei celule electrochimice formata din 3 electrozi: electrodul de lucru, de referinta (vs Ag/AgCl) si contraelectrodul din platina.

CD4 + este co-receptor în Complexul major de histocompatibilitate (MHC) și se exprimă în cadrul unei subpopulații de limfocite T mature. Celulele T CD4+ sunt denumite "helper" datorită abilității lor de activare a răspunsului imun (Li și al., 2018; Brown și al., 2012; Bloom și Lambert, 2003).

Limfocitele T CD4+ reprezintă ținta selectivă a HIV (virusul imunodeficienței umane) (Joshi și al., 2015; Delves și Roitt 1998) de aceea în prezent determinarea celulelor T CD4+ constituie primul pas pentru inițierea terapiei anti-retrovirale (ART) și monitorizarea statusului clinic al pacientului privind deficiența imunologică în condițiile instalării AIDS (sindromul imunodeficienței dobândite) (Porichis și al., 2018; Shete și al., 2010).

Domeniul de aplicare este cel biomedical si anume laboratoare clinice, cabinete medicale sau camere de urgenta. Determinarea subpopulațiilor limfocitare T CD4+ se realizează cu acuratețe în prezent prin flow-citometrie. Metoda prezinta precizie și reproductibilitate înalta, însă este o tehnică complexă, necesită personal cu înaltă calificare și costuri mari privind consumabilele și mentenanța. De asemenea metoda ELISA se utilizează cu o sensibilitate de 97% pentru determinarea limfocitelor T CD4+ la concentrații mai mici de 350 celule/μL probă de sânge (Lifson si al., 2016; Shete și al., 2010; Urassa si al., 2003).

Astfel o abordare tehnologică inovativă precum diagnosticul POC (point-of-care) cu dispozitive medicale in vitro accesibile și ușor de utilizat în condiții cu resurse limitate și pentru persoane cu acces redus la servicii medicale este un subiect central al cercetării medicale în special în țările în curs de dezvoltare. Tehnologiile microfluidică, optică sau electrochimică sunt tehnologii emergente care folosesc dispozitive simple pentru detecția analitului de importanță clinică. Biosenzorii pentru detecția specifică a unui analit sunt aplicați în domenii variate întrucât oferă o



cale simplă, cu sensibilitate ridicată și cu posibilitatea efectuării testării on-site și în timp real. (Merlos Rodrigo și al., 2014; Lifson și al., 2016; Setty și Hewlett, 2014; Boyle și al., 2012).

Ma și colab. au obținut un sensor electrochimic din nanotuburi de carbon prin imprimare moleculară (MIP), capabil să detecteze antigenul p24 HIV (Ma și al., 2017) iar Gan și colab. au dezvoltat un imunosenzor electrochimic portabil pentru proteina antigen p24 HIV cu o sensibilitate de detecție mai mare de 1000 de ori comparativ cu rezultatele obținute prin metoda ELISA (Gan și al., 2013).

Procedeele de funcționalizare pentru detecția electrochimică a subpopulațiilor de celule T CD4+ cu ajutorul imunosenzorilor electrochimici interdigitați cu electrozi de aur prezentat în acest brevet oferă avantajul obținerii unor dispozitive medicale POC robuste, cu sensibilitate și precizie ridicate, reproductibili și ușor de utilizat. În prezent nu există un patent care să prezinte o metodă de funcționalizare a unei suprafețe de electrozi interdigitați pentru detecția celulelor limfocitare T CD4+.

Patentul US 2015/0377877 A1 prezintă un imunosenzor și metoda de obținere a sa prin depunerea succesivă a unor straturi autoasamblate de polimer cationic pentru detecția și cuantificarea oricărui analit sau antigen din probe lichide, precum sulfonamide, fluorochinolone, aminoglicozide, corticosteroizi, micotoxine, histamine, alergeni sau biomarkeri implicați în neuropatologii, îmbătrânire, boli metabolice și cardiovasculare și biomarkeri asociași proceselor inflamatorii și tumorale.

Patentul WO2015/040258 A1 prezintă un kit reprezentat de un imunosenzor electrochimic cu electrozi de carbon pentru detecția micotoxinei deoxonivalenol (DON) care folosește anticorpi specifici anti-DON imobilizați pe microparticule magnetice funcționalizate cu proteina G. Reacția imună este mediată de peroxidaza HRP (horseradish peroxidase) ca element de bio-recunoaștere.

De asemenea, în patentul WO 2014/014371 A1 este redată o metodă pentru obținerea unui imunosenzor cu electrozi din aur pentru detecția virusului Influenza. În cadrul metodei electrozii de aur au fost spălați în etanol, funcționalizați cu HDT (1,6-hexandiol), aplicarea de anticorpi anti-M la o concentrație de 28 $\mu\text{g/ml}$ în tampon PBS 0,1 M, urmată de aplicarea finală a 10 μIU de 0,5 % (w/v) albumină serică bovină timp de 2 h la 4°C.

Problema tehnică pe care o rezolva inventia de fata, consta in aceea ca procedeul prin care suprafata este functionalizata electrochimic orientat si verificata din punct de vedere a preciziei prin coeficientul de variatie permite determinarea cantitativa electrochimica directa (fara utilizarea unei molecule de detectie) a antigenului CD4+ in probe ce contin acest antigen in concentratii cunoscute.

Bioreceptorul este selectiv si specific pentru antigenul CD4+ deoarece prin procedeu se imobilizeaza orientat anticorpii anti CD4+ pentru recunoasterea acestuia iar cu ajutorul lui se pot determina concentratii de antigen de pana la 800 ng/mL.

Formarea bioreceptorilor, prin procedeul de functionalizare electrochimica, pe suprafetele interdigitate presupune in general parcurgerea urmatoarelor etape:

curatarea electrozilor de aur si verificarea gradului de curatare prin metoda spectrometriei de impedanta electrochimica (EIS) si CV in domeniul de potential $-0,2V - 1100 mV$ in regim Faradaic; verificare parametri electrochimici diferenta de potential anodic si catodic (ΔE_p) si rezistenta la transferal electronic R_T pe 10 suprafete interdigitate;

spalare cu etanol absolut si uscare;

se imerseaza electrozii interdigitati intr-un volum de $300 \mu L$ de solutie amestec cu tioli formata dintr-un raport volumetric de 7: 3 (3 mercapto propanol -3MPOH si acid 11 mercaptoundecanoic -11MUA) si se lasa timp de 2 ore la frigider intre $2- 8^{\circ}C$;

dupa incubare se spala cu etanol, se usuca la azot si se inregistreaza parametri electrochimici ΔE_p si R_T ;

se calculeaza gradul de acoperire pentru toate cele 10 suprafete utilizand rezistenta de transfer electronic (obtinuta din diagramele Nyquist Plot ($-Z_i$ vs Z_r) prin fitarea diagramelor obtinute cu *Auto RC fitting* din programul VoltaLabPGZ 100) dupa imersia in tioli (R'_T) si inainte de imersia in tioli (R_T) cu ecuatie:

$$\theta = (1 - R_T/R'_T)*100$$

se spala electrozii cu solutia de tampon fosfat (PBS, pH = 7,4), se usuca si se imerseaza intr-o solutie amestec formata din N-hidroxisuccinimida (NHS) si clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă carbodiimida (EDC) timp de 30 de minute la temperatura camerei;

se spala electrozii cu PBS si se usuca la azot;

se depun $40 \mu L$ de proteina G pe suprafata electrozilor, in picatura si se lasa la incubat acoperiti peste noapte la temperatura camerei;

dupa incubare, se spala cu PBS, se usuca si se citesc parametrii electrochimici (in regim faradaic);

adaugare $40 \mu L$ proteina de blocare Albumina Serica Bovina (BSA) 1% in solutie tampon PBS (pH=7,4) si incubare 30 minute la temperatura camerei;

spalare cu PBS, uscare azot, verificare parametri electrochimici si analitici;

adaugare pe suprafata interdigitate a fiecarui electrod cate $40 \mu L$ de solutie de anticorp anti-CD4+;

incubare la 4°C peste noapte;

spalare cu solutie PBS, uscare si verificarea parametrilor electrochimici a suprafetelor bioreceptoare formate cu anticorpi anti-CD4;

demonstrare functionalitate electrozi interdigitati fabricati prin procedeul de fata prin incubarea cu concentratii cunoscute de CD4+ antigen in solutie tampon fosfat (PBS, pH=7,4) si trasarea curbei de calibrare; calcularea sensibilitatii metodei utilizand curba de calibrare si panta dreptei de regresie; concentratii de antigen folosite: I.0ng/mL; II.12,5ng/mL; III.25ng/mL; IV.50ng/mL; V.100ng/mL;VI. 200ng/mL; VII.300ng/mL;VIII.400ng/mL; IX. 800ng/mL;

Molecula de antigen CD4 este imobilizata pe suprafetele interdigitate datorita afinitatii mari pe care o prezinta antigenul pentru bioreceptorii formati pe suprafete , anticorpii si mai exact pentru regiunea Fab a acestora care, datorita procedului de functionalizare chimica ce implica formarea de legaturi covalente intre gruparile carboxil terminale ale MUA a unui film SAMs (monostraturi autoasamblate) cu lanturi de tioli terminate cu grupari carboxil si cu lanturi scurte terminate cu hidroxil si proteina G. Aceasta proteina recunoaste specific regiunea Fc (fragment cristalizabil) a anticorpilor specifici antigenului CD4+ permitand aranjarea acestora intr-o maniera orientata cu portiunea Fab (fragment de legare cu antigenul) a anticorpilor catre antigen. Avantajul bioreceptorilor ce contin molecule de SAMs mixte, consta in posibilitatea de a obtine un semnal electrochimic bun pe un domeniu larg de concentratii de CD4+.

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

fig.1. Cipul pe care se afla aria electrozilor interdigitate (C) si padurile de conexiune electrozi (B) la VoltaLab PGZ 100 (A).

fig 2. Verificare EIS (plotare Nyquist) si CV a tuturor etapelor de curatare a electrozilor interdigitati in solutie de tampon fosfat (pH=7,4) cu 2,5mM Fe (CN)₆⁴⁻si 2,5mM de Fe (CN)₆³⁻ : A. Voltamograma ciclica a electrozului de au curatat cu raportul curenților de pic ≈1. B. Plotari Nyquist (-Zi vs Zr) a electrozului de aur dupa curatare in solutia electrolit de tampon fosfat (pH=7,4) cu 2,5 mM Fe (CN)₆⁴⁻si 2,5 mM de Fe (CN)₆³⁻, domeniu frecvente 100kHz- 100mHz;

fig.3. Verificare EIS (plotare Nyquist) si CV dupa etapa de imersia in tioli in solutie de tampon fosfat (pH=7,4) cu 2,5mM Fe (CN)₆⁴⁻si 2,5mM de Fe (CN)₆³⁻ : A. Voltamograme ciclice B. Plotari Nyquist (-Zi vs Zr) in solutia electrolit de tampon fosfat (pH=7,4) cu 2,5 mM Fe (CN)₆⁴⁻ si 2,5 mM de Fe (CN)₆³⁻, domeniu frecvente 100kHz- 100mHz;

fig.4 Verificare EIS (plotare Nyquist) si CV dupa etapa de formare a bioreceptorilor prin procedeul descris mai sus: A. Voltamograme ciclice B. Plotari Nyquist (-Zi vs Zr) in solutia electrolit de tampon fosfat (pH=7,4) cu 2,5 mM Fe (CN)₆⁴⁻si 2,5 mM de Fe (CN)₆³⁻, domeniu frecvente 100kHz- 100mHz;

fig.5 Diagrame Nyquist (-Zi vs Zr) utilizand *RC Fitting* (VoltaLab PGZ 100) dupa incubari ale bioreceptorului cu concentratii progresive cunoscute de antigen CD4+ in solutie tampon fosfat (pH=7,4) : I.0ng/mL;II.12,5ng/mL;III.25ng/mL;IV.50ng/mL;V.100ng/mL;VI. 200ng/mL;

31

VII.300ng/mL;VIII.400ng/mL; IX. 800ng/mL; (verificare in solutia electrolit de tampon fosfat (pH=7,4) cu 5mM Fe (CN)₆⁴⁻si 5mM de Fe (CN)₆³⁻, domeniu frecvente 100kHz- 100 mHz);

fig.6A Curba de calibrare (model sigmoid) reprezentare raport $\frac{R_{T_i}}{R_{T_0}}$ in functie de concentratiile de antigen CD4+;

fig.6B Curba de calibrare (model linear) reprezentare raport $\frac{R_{T_i}}{R_{T_0}}$ in functie de concentratiile de antigen CD4+;

Tabel 1. Valori parametric electrochimici dupa etape de functionalizare :

Curatare electrozi interdigitate (IDGs); dupa curatare IDGs si formare SAMs (IDGs/SAMs); dupa curatare IDGs, formare SAMs/Activare cu EDC si NHS/Blocare si imobilizare Proteina G (IDGs/SAMs/EDC/NHS/Blocare/Proteina G);dupa formare bioreceptori cu anticorpi anti-CD4+;

Exemplu:

Curatarea electrochimica a suprafetelor si verificarea comportarii electrochimice a suprafetei curatate prin inregistrarea voltamogramelor ciclice dupa baleierea potentialului intre (0 si - 1200 mV) apoi intre (0 si 800 mV) cate 5 cicluri fiecare in solutie de PBS ce contine un amestec de mediatori chimici 2,5 mM Fe (CN)₆⁴⁻si 2,5 mM de Fe (CN)₆³⁻; inregistrarea spectrelor CV si EIS dupa curatare: obtinerea voltamogramei caracteristice reducerii si oxidarii electrodului interdigitata pe domeniul de potential dar si a diagramelor Nyquist (-Zi vs Zr) pe domeniul de frecvente 100kHz-100mHz-;

imersarea suprafetelor interdigitate in solutia de tioli micsti, spalare dupa incubare 2h la frigider; inregistrarea diagramelor Nyquist si a voltamogramelor ciclice pe acelasi domeniu de potential;calcularea gradului de acoperire θ care trebuie sa fie cuprins intre 80-90%;

adaugare proteina G in picatura pe suprafata electrozilor interdigitate; spalare cu PBS si incubarea cu BSA pentru blocarea situsurilor nereactive;

spalare, uscare la azot si inregistrare parametri electrochimici din curbele CV si diagramele Nyquist EIS (ΔE_p si R_T); spalare cu PBS si adaugare anticorp anti-CD4+ in picatura, incubare peste noapte la frigider;

spalare cu PBS, uscare si inregistrare CV si EIS , calcularea parametrilor electrochimici ΔE_p si R_T ;

incubarea electrozilor interdigitate timp de 30 minute la 37°C, cu cate 25 μ L de concentratii cunoscute (introduse in solutie tampon fosfat, pH=7,4) progresive si seriale de CD4+: I.0ng/mL; II.12,5ng/mL; III.25ng/mL; IV.50ng/mL; V.100ng/mL; VI. 200ng/mL; VII.300ng/mL;VIII.400ng/mL; IX. 800ng/mL;

spalare cu PBS, uscare si inregistrarea diagramelor Nyquist pentru dupa incubarea cu fiecare concentratie;

calcularea mediei R_{T_0} pentru 10 electrozi interdigitati martor (fara antigen);

calculare mediilor rezistentelor obtinute din fitarea diagramelor Nyquist ($-Z_i$ vs Z_r) dupa incubarea cu fiecare concentratie in parte R_{T_i} , unde i reprezinta numarul de concentratii folosite;

trasarea curbei de calibrare ca raport intre rezistenta, calculata dupa incubare cu concentratia de antigen si rezistenta dupa incubarea cu concentratia 0 ($\frac{R_{T_i}}{R_{T_0}}$) in functie de concentratiile cu care electrozii au fost incubati.

REVENDICARI

1. Revendicarea se refera procedeul prin care se realizeaza bioreceptori pe electrozii interdigitati de aur pentru detectia electrochimica "label free" a antigenului CD4+ din probe de tampon, **bioreceptori caracterizati prin aceea ca se realizeaza astfel: curatarea electrochimica a electrozilor interdigitate de aur cu verificarea comportarii electrochimice a suprafetei curatate prin inregistrarea voltamogramelor ciclice dupa baleierea potentialului intre (-0,2V si - 600mV) 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⁻ apoi calcularea valorilor parametrilor electrochimici specifici voltamogramelor si a diagramelor Nyquist (-Zi vs Zr) si anume diferenta dintre potentialul anodic si potentialul catodic (ΔE_p) si rezistenta la transferul electronic (R_T) dupa fitarea diagramelor Nyquist cu Auto R Fitting apoi se continua cu spalare cu tampon fosfat (7,4) si uscare la aer a electrozilor **dupa care** se imerseaza intr-un volum de 300 μ L din amestecul de tioli mercaptopropanol (3MPOH) si acid mercaptoundecanoic (11MUA) in raport volumetric 7: 3 in solvent de etanol absolut cu formare strat autoasamblat mixt (mSAMs) si se lasa la autoasamblat timp de 2 ore la 2- 8°C rezultand un strat autoasamblat mixt cu grad de acoperire, θ cuprins intre 80-100 % si **apoi** se spala cu etanol absolut dupa care se usuca la azot **urmeaza** activarea grupurilor carboxil ale 11 MUA, prin imersarea in solutie amestec de NHS si EDC (in apa) in raport molar de 1: 6 (NHS:EDC) timp de 30 de minute la temperatura camerei si verificarea electrochimica (tehnica EIS si CV) a interactiei ionilor din solutie cu electrozii apoi se depun 40 μ L de proteina G (PG) pe suprafata electrozilor si se lasa peste noapte timp de 18h , la temperatura camerei **dupa care se incubeaza** si se clatesc din abundenta cu tampon fosfat (pH=7,4) **apoi** se usuca la aer si se citeste electrochimic in regim Faradaic (2,5 mM Fe (CN)₆⁴⁻ si 2,5 mM de Fe (CN)₆³⁻ si se **continua cu** adaugarea unei picaturi (40 μ L) pe aria electrozilor interdigitati din solutia de proteina de blocare BSA 1% in tampon fosfat (PBS, pH=7,4) **dupa care se incubeaza** la temperatura camerei timp de 30 de minute apoi se usuca la aer si urmeaza adaugarea unei picaturi (40 μ L) de solutie anticorp anti-CD4+ pe electrozii interdigitati cu formare bioreceptori specifici pentru antigen CD4+ dupa care urmeaza uscarea si verificarea parametrilor electrochimici si apoi se demonstreaza aplicabilitatea sensorilor electrochimici interdigitati pentru detectia antigenului CD4+ prin incubarea la 37°C timp de 30 de minute cu concentratii cunoscute de CD4 in domeniul 12,5 ng/mL - 800 ng/mL si **dupa care** se determina raportul dintre rezistenta de transfer la suprafata electrozilor dupa adaugarea concentratiei de antigen CD4 in tampon fosfat si rezistenta electrozilor pe care sunt imobilizati bioreceptorii rezistente masurate in regim Faradaic din diagramele Nyquist (-Zi vs Zr) pe domeniul de frecvente 100kHz-100mHz **apoi** urmeaza construirea curbelor de calibrare prin realizarea de dilutii seriale in tampon fosfat (pH=7,4) in domeniul 12,5 ng/mL - 800 ng/mL; regresia lineara arata o corelare de $R^2=0.952$ pe**

domeniul 12,5 ng/mL – 400 ng/mL cu model linear si un coefficient de $R^2=0.978$ utilizand model sigmoid pe domeniul de concentratii 12,5 ng/mL – 800 ng/mL.

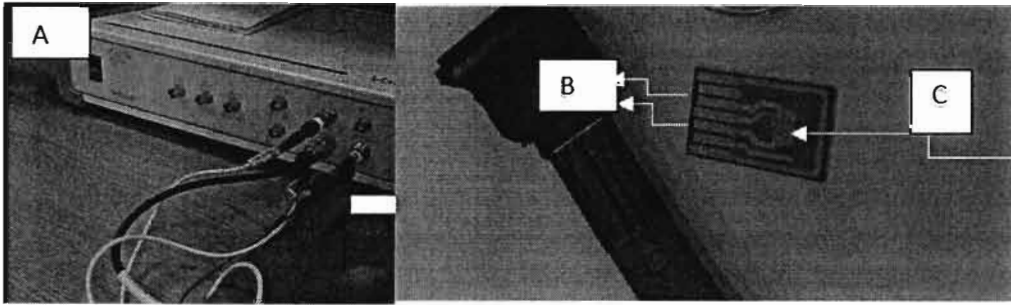


fig.1

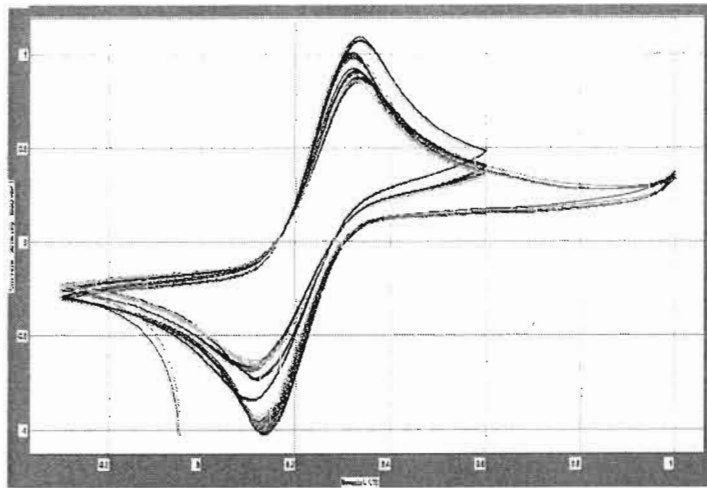


fig.2A

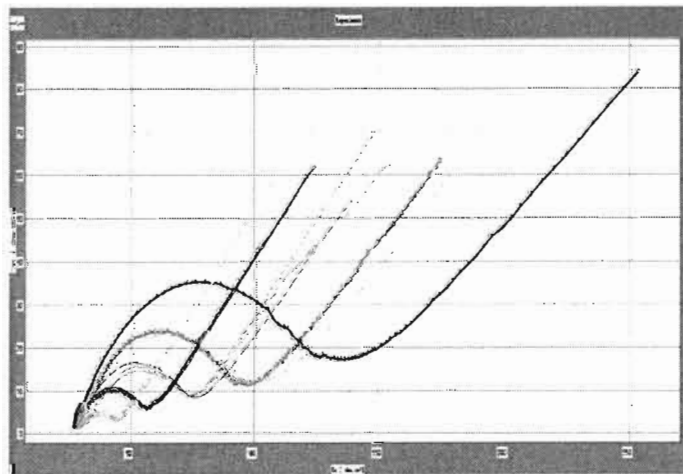


fig.2B

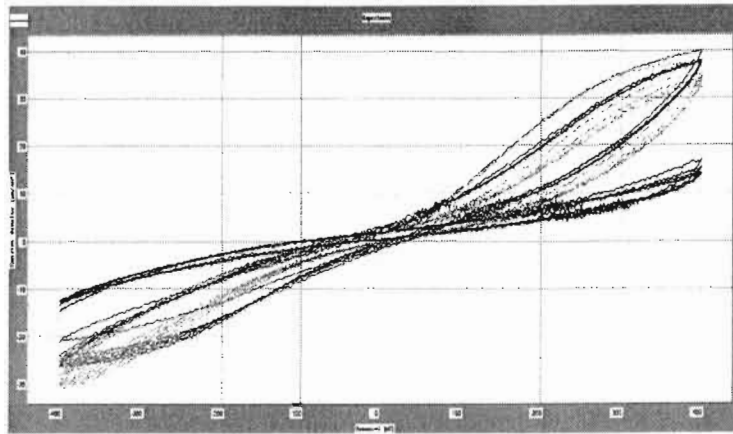


fig.3A

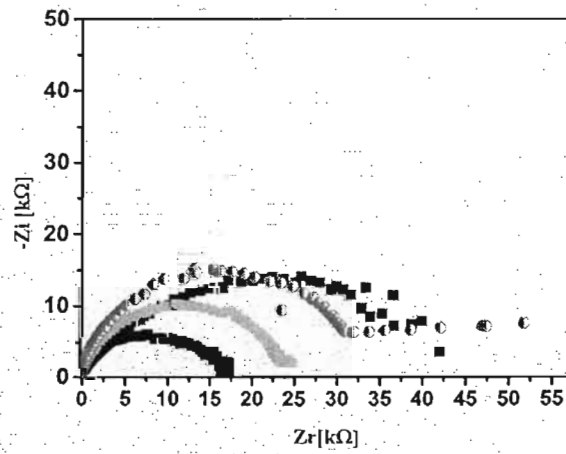


fig.3B

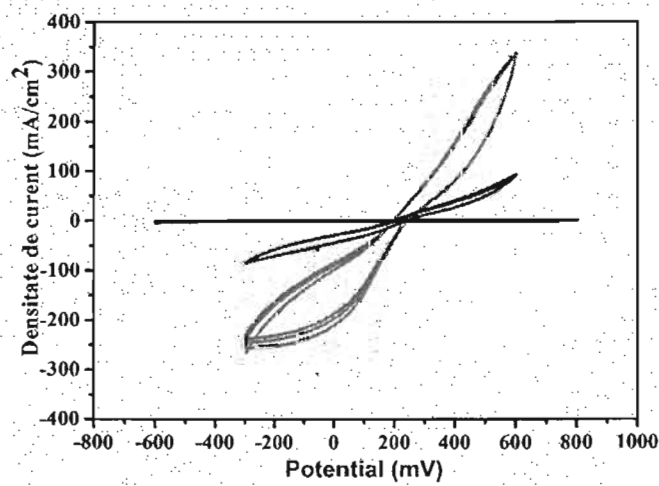


fig.4A

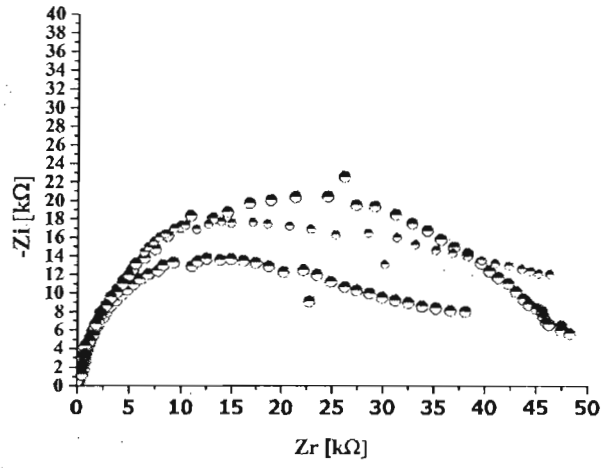


fig.4B

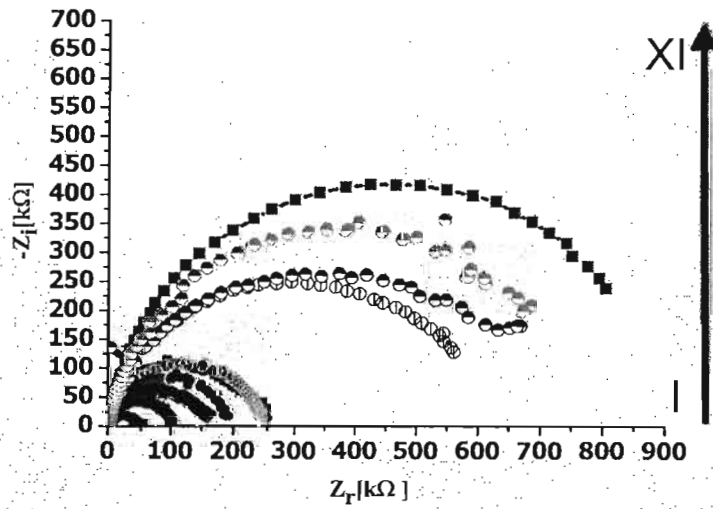


fig.5

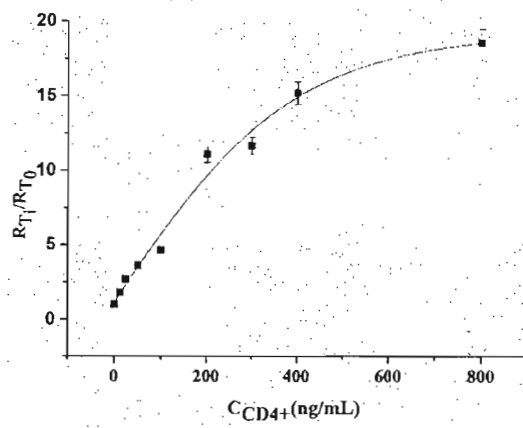


fig. 6A

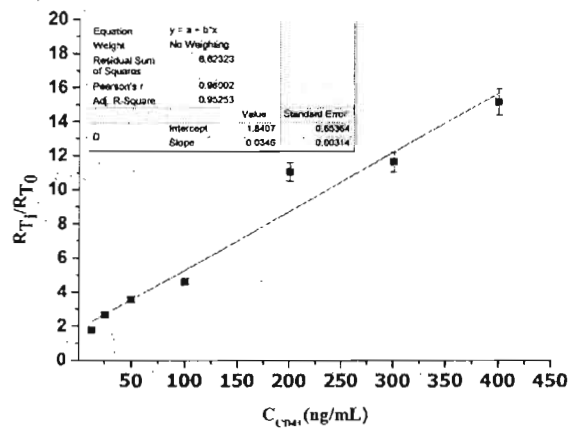


fig.6B

Denumire etapa	$\overline{\Delta E_p}^*(mV)$	$\overline{R_T}^*$	Θ (%) [*]
Curatare IDG	110±8	20Ω±2 Ω	-
IDGs/SAMs mixt	450±40	20kΩ±5kΩ	99%±15%
IDGs/SAMs/EDC/NHS Blocare / Proteina G	722±138	35.16±5kΩ	-
Bioreceptori anti-CD4+	780±110	50±5kΩ	-

Tabel 1

* ΔE_p si R_T au fost calculati ca medie a 10 electrozi interdigitati