



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00884

(22) Data de depozit: 11/12/2019

(41) Data publicării cererii:
27/11/2020 BOPI nr. 11/2020

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
DEZVOLTARE PENTRU FIZICA
MATERIALELOR (INCDFM),
STR.ATOMIȘTILOR, NR.405A, CP.MG-7,
MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• IGNAT BARSAN MĂDĂLINA MARIA,
STR.CRIZANTEMELOR, NR.21A, ET.2,
AP.6, MĂGURELE, IF, RO;
• DICULESCU VICTOR CONSTANTIN,
STR.NERVA TRAIAN, NR.16, BL.M35, SC.3,
ET.7, AP.88, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) BIOSENZOR ELECTROCHIMIC PENTRU EVALUAREA
ACTIVITĂȚII ȘI INHIBIȚIEI PROTEAZOMULUI 20S
PENTRU SCREENING-UL DE COMPUȘI CHIMICI
CU POTENȚIALE APLICAȚII FARMACEUTICE

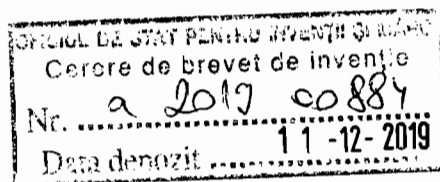
(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detectare și caracterizare a activității enzimice a proteazomului 20S utilizată pentru detecția precoce a unor anomalii medicale, în special de natură canceroasă sau neurodegenerativă. Metoda, conform invenției, constă în utilizarea unui biosenzor electrochimic cu proteazom 20S construit prin imobilizarea într-un singur pas a proteazomului 20S pe electrozi modificați în prealabil cu anticorpi specifici subunității β 5i a complexului enzimatic prin

reticulare cu aldehidă glutarică în prezență de albumină serică bovină, și a unui substrat peptidic marcat pentru detecție cu 4-amino-7-metil-cumarină, prin cronoamperometrie la potențial fix, care permite detecția unor cantități foarte mici de analit, cu o limită de detecție de ordinul nanomolar.

Revendicări: 3
Figuri: 3





DESCRIERE

Proteazomul 20S este un complex enzimatic implicat în degradarea proteolitică a proteinelor danificate/lezionate. Este format din patru inele heptamerice suprapuse ceea ce îi conferă o formă cilindrică. Inelele externe asociate din punct de vedere geometric bazelor cilindricului sunt formate din subunități de tip α și au rolul de a asigura accesul lanțurilor peptidice la inelele interioare de tip β 1, 2 și 5 [1] (vezi Figura 1) responsabile pentru cele trei activități enzimatică ale proteazomului: caspază, tripsină, respectiv chimotripsină. Investigațiile asupra funcțiilor proteazomului au arătat că modificări ale activității enzimatică ale acestuia sunt strâns legate de existența unor anomalii medicale, în special de natură canceroasă sau neurodegenerativă. De exemplu, o activitate atipică crescută a proteazomului s-a observat în celulele maligne, capabile să producă proteine care pot, pe de o parte, promova proliferarea celulelor dar și, pe de altă parte, inhiba procesele de apoptoză. Astfel, noi metode de tratament ale cancerului implică utilizarea de inhibitori ai proteazomului [2–6]. De asemenea, o activitate scăzută a proteazomului s-a observat în cazul bolilor neurodegenerative. Proteinele predispuse la agregare, asociate cu aceste boli, compromit activitatea proteazomului și întârzie astfel degradarea altora, ceea ce determină apariția de depozite proteice în neuronii afectați. Se observă astfel că detectarea și caracterizarea activității enzimatică a proteazomului este esențială atât pentru detecția precoce a acestor boli, cât și pentru dezvoltarea de tratamente pe bază de inhibitori enzimatici ai acestuia.

Metodele utilizate pentru dezvoltare de compuși farmaceutici (*high-throughput screening*) în general și inhibitori ai proteazomului în special necesită tehnici extrem de complexe și costisitoare. Această ramură de cercetare este într-o continuă dezvoltare și permite sintetizarea de inhibitori marcați direcționați către un anumit centru catalitic, pentru a face posibilă determinarea unei activități specifice ale acestuia și specificitatea unui anumit inhibitor [7].

Metodele dezvoltate pentru evidențierea activității proteazomului *in vitro* și *in vivo* sunt bazate pe utilizarea substraturilor peptidice fluorogenice, acestea fiind cel mai des raportate [8,9], dar și pe imagistica bioluminescentă [10]. De asemenea, există studii asupra utilizării metodelor electrochimice pentru evidențierea activității și inhibiției proteazomului 20S dar aceste investigații sunt efectuate în soluții incubate [11,12]. Brevetele de invenție raportate pentru detecția activității proteazomului sunt bazate pe peptide fluorogenice [13] și biochemiluminescență [13–15].

Metoda de măsurare a activității și inhibiției proteazomului 20S conform invenției se bazează pe utilizarea unui biosenzor electrochimic cu proteazom 20S construit prin imobilizarea



într-un singur pas a proteazomului 20S pe electrozi modificați în prealabil cu anticorpii specifici subunității $\beta 5i$ a acestuia. Biosenzorul electrochimic cu proteazom 20S astfel obținut este aplicat pentru detecția electrochimică, utilizând cronoamperometria la potențial fix, a unui compus electroactiv rezultat în urma clivajului enzimatic a peptidelor marcate cu acesta. Astfel, pe de o parte, biosenzorul electrochimic cu proteazom 20S permite evaluarea celor trei activități enzimatice ale acestuia de caspază, tripsină și chimotripsină cu același biosenzor, în funcție de substratul specific ales pentru detecție. Pe de altă parte, biosenzorul electrochimic cu proteazom 20S permite *screening*-ul de compuși chimici cu efect inhibitor, cu potențiale aplicații terapeutice, prin monitorizarea efectului compusului propus asupra răspunsului biosenzorului, mai exact prin diminuarea activității enzimatice a proteazomului 20S.

Avantajele cheie aduse de prezenta metodă rezolvă problemele critice ale metodelor deja existente de detecție a activității proteazomului și sunt:

- i) reducerea semnificativă a costurilor aferente proceselor de *screening* de compuși chimici cu proprietăți farmaceutice prin utilizarea unor cantități mici de reagenți și prin folosirea de tehnici electrochimice ce necesită un potențiostat portabil conectat la un laptop;
- ii) eficiența metodei prin utilizarea tehnicilor de detecție electrochimică rapide, sensibile și economice care utilizează ca dispozitiv de detecție un biosenzor cu stabilitate operațională mare și care poate fi refolosit pentru diferite măsurători;
- iii) specificitate sporită prin aceea că dispozitivul folosește un strat de anticorpi ai subunităților $\beta 5i$ ale proteazomului 20S permițând orientarea acestuia la suprafața biosenzorului astfel încât să faciliteze pătrunderea substratului enzimatic în centrul catalitic.

Se dă în continuare un exemplu de realizarea a invenției, în legătură cu figurile 1, 2 și 3 ce reprezintă:

- Figura 1. Reprezentare schematică a biosenzorului electrochimic pentru detecția activității enzimatice a 20S;
- Figura 2. Evaluarea activității enzimatice a proteazomului 20S prin utilizarea biosenzorului propus în prezenta invenției și a unui substrat peptidic marcat cu 4-amino-7-metil-cumarină (AMC), monitorizat prin amperometrie la potențial fix. Inserat - curba de calibrare corespondentă;
- Figura 3. Evaluarea inhibiției enzimatice a proteazomului 20S prin utilizarea biosenzorului propus în prezenta invenției, un substrat peptidic și un inhibitor.



Figura 1 ilustrează schematic construirea biosenzorului bazat pe un anticorp specific subunității $\beta 5i$. Necesitatea folosirii de anticorpi specifici subunităților β este dată de faptul că cei specifici subunităților α precum și cei policlonali nespecifici induc schimbări conformaționale ale proteazomului care blochează accesul substratului enzimatic în interiorul centrului catalitic. Pe de alta parte, utilizarea anticorpului specific subunității $\beta 5i$ permite orientarea proteazomului 20S la suprafața biosenzorului într-o poziție favorabilă atât substratului enzimatic cât și produșilor de reacție. Anticorpul este imobilizat prin reticulare cu aldehidă glutarică în prezența de albumină bovină serică. Electrocul astfel modificat este imersat într-o soluție de proteazom 20S pentru a permite formarea de legături între anticorp și proteazom și implicit imobilizarea acestuia pe electrod. Pentru aceasta se folosesc 0.5 μL soluție de anticorp de 1 mg mL^{-1} și 50 μL soluție de proteazom 20S de 1 mg mL^{-1} .

Figura 2 ilustrează un răspuns electrochimic al biosenzorului. Pentru evaluarea electrochimică a activității enzimatice a proteazomului 20S se utilizează diverse substraturi specifice activităților de caspază, tripsină și chimotripsină. Substraturile utilizate sunt lanțuri peptidice marcate cu un compus electroactiv, care este detectabil electrochimic după clivajul enzimatic. Tehnica utilizată este cronoamperometria la potențial fix, ceea ce permite detecția unor cantități foarte mici de analit, cu o limita de detecție de ordinul nanomolar. Potențialul aplicat este ales astfel încât să permită oxidarea compusului electroactiv eliberat în urma clivajului enzimatic. În cazul de față se exemplifică utilizarea unui substrat peptidic marcat cu 4-amino-7-metil-cumarină (AMC), a cărei detecție electrochimică se face la +0.80 V vs. Ag/AgCl.

Figura 3 ilustrează răspunsul electrochimic al biosenzorului în prezența unui substrat și a unui inhibitor enzimatic, înregistrat prin cronoamperometria la potențial fix de +0.80 V vs. Ag/AgCl. În cazul de față se exemplifică utilizarea de concentrații echimolare de substrat și inhibitor injectate într-o secvență de tipul substrat-inhibitor-substrat. Răspunsul biosenzorului este de 19.5% în prezența inhibitorului, ceea ce denota o scădere a activității enzimatice a proteazomului 20S.

REVENDICĂRI

1. Procedeu de imobilizare a proteazomului 20S prin legături de bioafinitate de tip anticorp-antigenă pe electrozi de carbon modificați în prealabil cu anticorpi specifici subunității $\beta 5i$ a proteazomului 20S prin reticulare cu aldehydă glutarică în prezența de albumină bovină serică.
2. Procedeu de detecție electrochimică a activității enzimatică a proteazomului 20S cu ajutorul biosenzorului electrochimic cu proteazom 20S obținut conform revendicării 1, prin măsurarea semnalelor de oxidare a *marker*-ilor electroactivi eliberați în urma clivajului enzimatic a peptidelor marcate cu aceștia.
3. Procedeu de *screening* de compuși chimici cu potențiale aplicații farmaceutice cu ajutorul biosenzorului electrochimic cu proteazom 20S obținut conform revendicării 1, prin măsurarea efectului de inhibiție enzimatică asupra activității proteazomului 20S determinat conform revendicării 2.



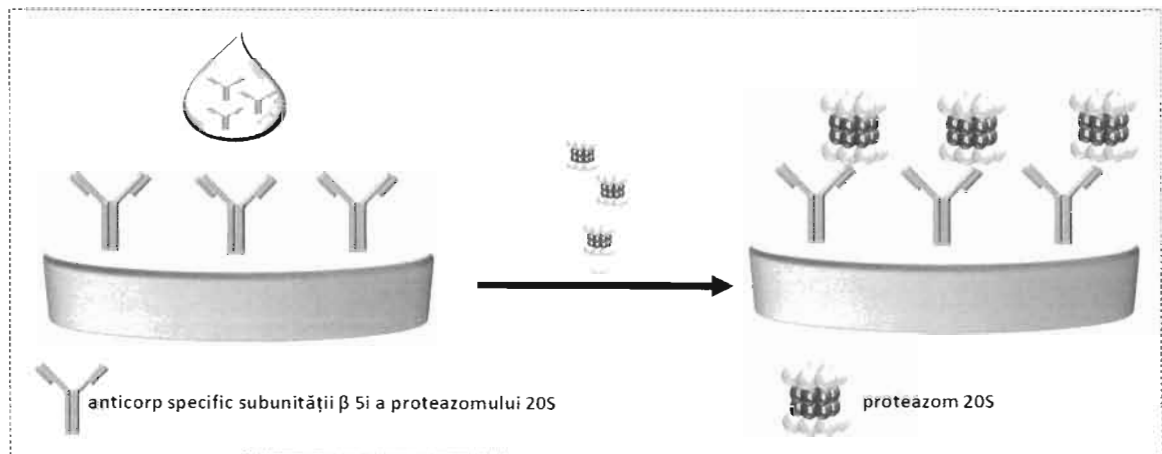


Figura 1.

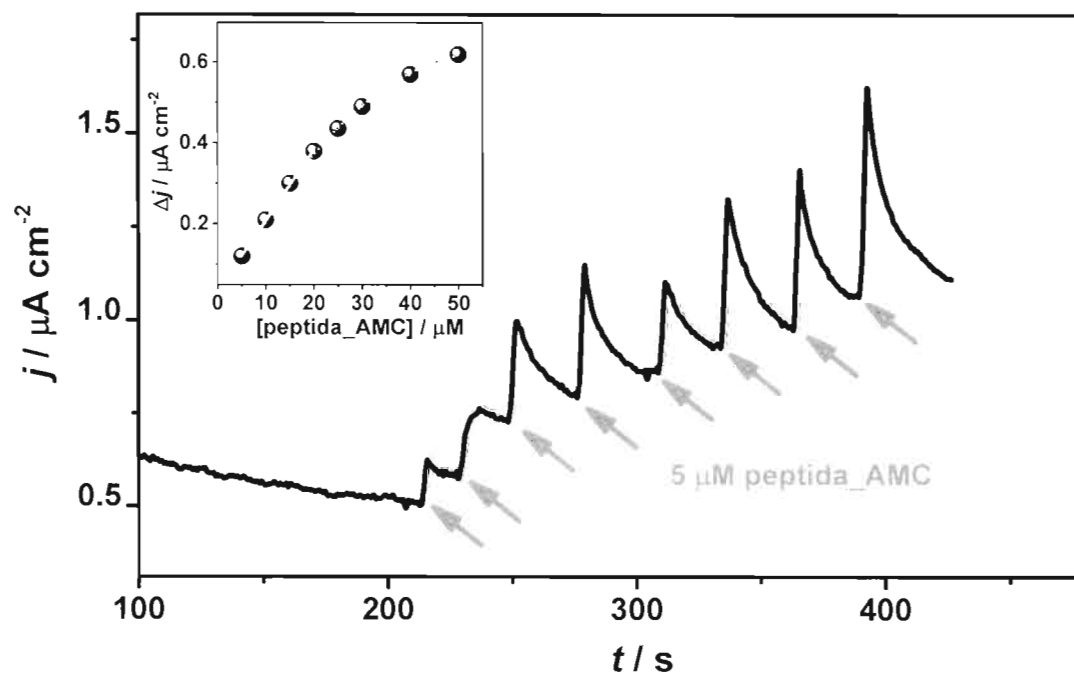


Figura 2

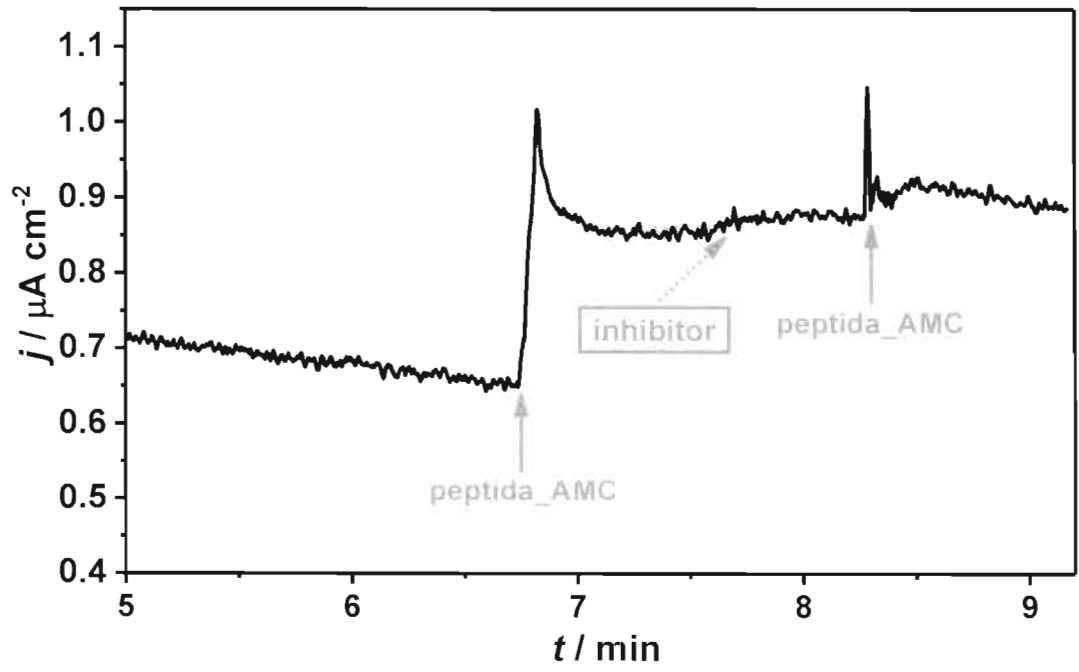


Figura 3