



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2019 00884**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/12/2022** BOPI nr. **12/2022**

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

(73) Titular:  
• **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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**C. S. HENRIQUES DE JESUS, A. M.  
CHIORCEA-PAQUIM, M. M. BÂRSAN, V. C.  
DICULESCU, "ELECTROCHEMICAL  
ASSAY FOR 20S PROTEASOME ACTIVITY  
AND INHIBITION WITH ANTI-CANCER  
DRUGS", VOL. 199, PP. 32-39, TALANTA,  
2019; L. EI HARRAD AND A. AMINE,  
"CHRONOAMPEROMETRIC BIOSENSOR  
FOR PROTEASE ACTIVITY ASSAY AND  
INHIBITOR SCREENING",  
ELECTROANALYSIS, VOL. 29, PP. 1-7,  
2017; DRL10003, PINE RESEARCH,  
"ELECTROCHEMICAL-ENZYMATIC  
DETERMINATION OF GLUCOSE IN  
BEVERAGES", 2016**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI BIOSENZOR  
ELECTROCHIMIC CU PROTEAZOM 20S, BIOSENZOR  
ASTFEL OBȚINUT, METODĂ DE EVALUARE  
ELECTROCHIMICĂ A ACTIVITĂȚII ENZIMATICE A  
PROTEAZOMULUI 20S ȘI METODĂ DE SCREENING  
DECOMPUȘI CHIMICI CU ROL DE INHIBITORI AI  
PROTEAZOMU LUI**



# RO 134569 B1

1           Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor electrochimic cu pro-  
teazom 20S, la biosenzorul astfel obținut, la o metodă de evaluare electrochimică a activității  
3           enzimatice a proteazomului 20S cu ajutorul biosenzorului și la o metodă de screening de  
compuși chimici cu rol de inhibitori ai proteazomului.

5           Proteazomul 20S este un complex enzimatic implicat în degradarea proteolitică a  
proteinelor danificate/lezionate. Este format din patru inele heptamerice suprapuse, ceea ce  
7           îi conferă o formă cilindrică. Inelele externe asociate din punct de vedere geometric bazelor  
cilindricului sunt formate din subunități de tip  $\alpha$  și au rolul de a asigura accesul lanțurilor  
9           peptidice la inelele interioare de tip  $\beta$  1, 2 și 5 [1] (vezi fig. 1) responsabile pentru cele trei  
activități enzimatice ale proteazomului: caspază, tripsină, respectiv chimotripsină.  
11          Investigațiile asupra funcțiilor proteazomului au arătat că modificări ale activității enzimatice  
ale acestuia sunt strâns legate de existența unor anomalii medicale, în special de natură  
13          canceroasă sau neurodegenerativă. De exemplu, o activitate atipică crescută a pro-  
teazomului s-a observat în celulele maligne, capabile să producă proteine care pot, pe de  
15          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  
17          [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  
19          activitatea proteazomului și întârzie astfel degradarea altora, ceea ce determină apariția de  
depozite proteice în neuronii afectați. Se observă astfel că detectarea și caracterizarea acti-  
21          vității enzimatice a proteazomului este esențială atât pentru detecția precoce a acestor boli,  
cât și pentru dezvoltarea de tratamente pe bază de inhibitori enzimatici ai acestuia.

23          Metodele utilizate pentru dezvoltare de compuși farmaceutici (high-throughput  
screening) în general și inhibitori ai proteazomului în special necesită tehnici extrem de com-  
25          plexe 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  
27          posibilă determinarea unei activități specifice ale acestuia și specificitatea unui anumit  
inhibitor [7].

29          Metodele dezvoltate pentru evidențierea activității proteazomului *in vitro* și *in vivo* sunt  
bazate pe utilizarea substraturilor peptidice fluorogenice, acestea fiind cel mai des raportate  
31          [8, 9], dar și pe imagistica bioluminescentă [10]. De asemenea, există studii asupra utilizării  
metodelor electrochimice pentru evidențierea activității și inhibiției proteazomului 20S, dar  
33          aceste investigații sunt efectuate în soluții incubate [11, 12]. Brevetele de invenție raportate  
pentru detecția activității proteazomului sunt bazate pe peptide fluorogenice [13] și bio-  
35          chemiluminescență [13-15].

37          Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a evalua caracterul unor  
compuși chimici, de a se comporta ca inhibitori ai proteazomului 20S.

39          Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor cu proteazom 20S prin  
imobilizarea proteazomului 20S folosind legături de bioafinitate de tip anticorp-antigenă pe  
un electrod modificat în prealabil cu anticorpi specifici subunității  $\beta 5i$  a protezomului 20S prin  
41          reticulare cu aldehidă glutarică în prezență de albumină bovină serică.

43          De asemenea, invenția se referă și la biosenzorul cu proteazom 20S obținut conform  
procedului definit mai sus.

45          Invenția se mai referă la o metodă de evaluare electrochimică a activității enzimatice  
a proteazomului 20S cu ajutorul biosenzorului care face obiectul prezentei invenției, care  
cuprinde măsurarea semnalului de oxidare a unui compus electroactiv cu care este marcat  
47          un substrat specific pentru una dintre activitățile de caspază, tripsină și chimotripsină a  
proteazomului 20S, compusul electroactiv fiind detectabil electrochimic după scindarea  
49          enzimatică a substratului marcat cu acest compus sub acțiunea proteazomului.

Un alt obiect al invenției referă la o metodă de screening de compuși chimici cu rol de inhibitori ai proteazomului 20S, care cuprinde punerea în contact a biosenzorului care face obiectul prezentei invenției cu o probă care conține un compus chimic potențial inhibitor și un substrat specific pentru una dintre activitățile enzimatiche de caspază, tripsină și chimo-tripsină a proteazomului 20S și monitorizarea răspunsului biosenzorului, adică monitorizarea scăderii activității enzimatiche a proteazomului 20S determinată în prealabil prin metoda de evaluare electrochimică definită mai sus.

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 potențostat 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.

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 enzimatiche ale acestuia de caspază, tripsină și chimo-tripsină 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 enzimatiche a proteazomului 20S.

Se dă în continuare un exemplu de realizarea a invenției, în legătură cu fig. 1...3 ce reprezintă:

- fig. 1, reprezentare schematică a biosenzorului electrochimic pentru detecția activității enzimatiche a 20S;

- fig. 2, evaluarea activității enzimatiche 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;

- fig. 3, evaluarea inhibiției enzimatiche a proteazomului 20S prin utilizarea biosenzorului propus în prezenta invenției, un substrat peptidic și un inhibitor.

Fig. 1, ilustrează schematic construirea biosenzorului bazat pe un anticorp specific subunității  $\beta 5i$ . Necesitatea folosirii de anticorpi specifici subunităților  $\beta 5i$  este dată de faptul că cei specifici subunităților  $\alpha$  precum și cei policlonali nespecifici induc schimbări conformaționale ale proteazomului care blochează accesul substratului enzimatic în interiorul centrului catalitic. Pe de altă 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. Anticorpii sunt imobilizați la suprafața electrodului de

1 lucru, unde electrodul de lucru reprezintă orice material conductor sau semiconductor necon-  
taminat sau curățat prin procedee chimice și mecanice. Imobilizarea se realizează prin reticu-  
3 lare cu aldehydă glutarică în prezența de albumină bovină serică, în proporții ce trebuie deter-  
minate de utilizator în funcție de materialul de electrod ales. Electrocul astfel modificat este  
5 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  $\mu\text{L}$   
7 soluție de anticorp de 1  $\text{mg mL}^{-1}$  și 50  $\mu\text{L}$  soluție de proteazom 20S de 1  $\text{mg mL}^{-1}$ .

Fig. 2, ilustrează un răspuns electrochimic al biosenzorului. Pentru evaluarea electro-  
9 chimică a activității enzimatică a proteazomului 20S se utilizează diverse substraturi specifice  
activităților de caspază, tripsină și chimotripsină. Substraturile utilizate sunt lanțuri peptidice  
11 marcate cu un compus electroactiv, care este detectabil electrochimic după clivajul enzi-  
matic. Tehnica utilizată este cronoamperometria la potențial fix, ceea ce permite detecția  
13 unor cantități foarte mici de analit, cu o limită de detecție de ordinul nanomolar, calculată pe  
baza unui raport semnal/zgomot egal cu 3. Potențialul aplicat este ales astfel încât să per-  
15 mită 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),  
17 a cărui detecție electrochimică se face la +0,80 V vs. Ag/AgCl în electrolit specific activității  
proteazomului 20S și compus din 50 mM Tris/HCl, 25 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>,  
19 100  $\mu\text{M}$  SDS.

Fig. 3, ilustrează răspunsul electrochimic al biosenzorului în prezența unui substrat  
21 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  
23 și inhibitor injectate într-o secvență de tipul substrat-inhibitor-substrat. Răspunsul  
biosenzorului este de 19,5% în prezența inhibitorului, ceea ce denotă o scădere a activității  
25 enzimatică a proteazomului 20S.

## 27 Bibliografie

29 [1] E. Kish-Trier, C.P. Hill, *Structural biology of the proteasome*, Annu Rev Biophys,  
42, (2013), 29-49.

31 [2] A. Gozzetti, G. Papini, V. Candi, C. Z. Brambilla, S. Sirianni, M. Bocchia, *Second*  
*generation proteasome inhibitors in multiple myeloma*, Anticancer. Agents Med. Chem., 17,  
33 (2017), 920-926.

[3] G. S. Kaplan, C. C. Torcun, T. Grune, N. K. Ozer, B. Karademir, *Proteasome*  
35 *inhibitors in cancer therapy: Treatment regimen and peripheral neuropathy as a side effect*,  
Free Radic. Biol. Med., 103, (2017), 1-13.

37 [4] E. E. Manasanch, R. Z. Orlowski, *Proteasome inhibitors in cancer therapy*, Nat.  
Publ. Gr., 14, (2017), 417-433.

39 [5] Y.-J. Chen, H. Wu, X.-Z. Shen, *The ubiquitin-proteasome system and its potențial*  
*application in hepatocellular carcinoma therapy*, Cancer Lett., 379, (2016), 245-252.

41 [6] J. B. Almond, G. M. Cohen, *The proteasome: a novel target for cancer*  
*chemotherapy*, Leuk. Off. J. Leuk. Soc. Am. Leuk. Res. Fund, U.K., 16, (2002), 433-443.

43 [7] C. R. Berkers, M. Verdoes, E. Lichtman, E. Fiebigler, B. M. Kessler, K. C  
Anderson, H. L. Ploegh, H. Ovaa, P.J. Galardy, *Activity probe for in vivo profiling of the*  
45 *specificity of proteasome inhibitor bortezomib*, Nat. Methods., 2, (2005), 357-362.

[8] A. Liggett, L. J. Crawford, B. Walker, T.C.M. Morris, A.E. Irvine, *Methods for*  
47 *measuring proteasome activity: Current limitations and future developments*, Leuk. Res. 34,  
(2010), 1403-1409.

## RO 134569 B1

- [9] A. F. Kisselev, A. L. Goldberg, *Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates*, *Methods Enzymol*, 398, (2005), 364-378. 1
- [10] G. D. Luker, C. M. Pica, J. Song, K. E. Luker, D. Piwnica-Worms, *Imaging 26S proteasome activity and inhibition in living mice*, *Nat. Med.*, 9, (2003), 969-973. 3
- [11] C. S. Henriques de Jesus, A. M. Chiorcea Paquim, V. C. Diculescu, *Voltammetric and atomic force microscopy characterization of chymotrypsin, trypsin and caspase activities of proteasome*, *Catal. Today*, (2016), 1-7. 5 7
- [12] C. S. Henriques de Jesus, A. M. Chiorcea-Paquim, M. M. Bârsan, V. C. Diculescu, *Electrochemical assay for 20S proteasome activity and inhibition with anti-cancer drugs*, *Talanta*, 199, (2019), 32-39. 9
- [13] K. Madura, *Methods of detecting mastitis by levels of proteasomes*, US 8183047 B2, 2012. 11
- [14] P. H. Turpin, Y. Fang, *Sensitive proteasome sensor constructs and methods for their design and use*, US 7258981 B2, 2007. 13
- [15] G. Lin, K. Nathan, P. Singh, L. Shi, L. Kirkman, *Proteasome inhibitors and uses thereof*, WO 2017/066763 A1, 2017. 15

# RO 134569 B1

## Revendicări

1

3

1. Procedeu de obținere a unui biosenzor cu proteazom 20S prin imobilizarea proteazomului 20S folosind legături de bioafinitate de tip anticorp-antigenă pe un electrod modificat în prealabil cu anticorpi specifici subunității  $\beta 5i$  a protezomului 20S prin reticulare cu aldehidă glutarică în prezență de albumină bovină serică.

5

7

2. Biosenzor cu proteazom 20S obținut conform procedeuului definit în revendicarea 1.

9

11

3. Metodă de evaluare electrochimică a activității enzimatică a proteazomului 20S cu ajutorul biosenzorului definit în revendicarea 2 care cuprinde măsurarea semnalului de oxidare a unui compus electroactiv cu care este marcat un substrat specific pentru una dintre activitățile de caspază, tripsină și chimotripsină a proteazomului 20S, compusul electroactiv fiind detectabil electrochimic după scindarea enzimatică a substratului marcat cu acest compus sub acțiunea proteazomului.

13

15

17

19

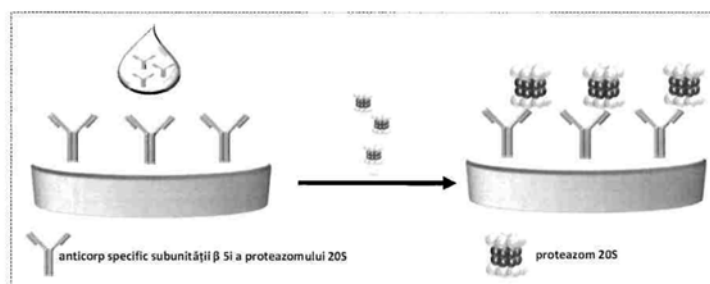
4. Metodă de screening de compuși chimici cu rol de inhibitori ai proteazomului 20S care cuprinde punerea în contact a biosenzorului definit la revendicarea 2 cu o probă care conține un compus chimic potențial inhibitor și un substrat specific pentru una dintre activitățile enzimatică de caspază, tripsină și chimotripsină a proteazomului 20S și monitorizarea răspunsului biosenzorului, adică monitorizarea scăderii activității enzimatică a proteazomului 20S determinată în prealabil prin metoda definită la revendicarea 3.

(51) Int.Cl.

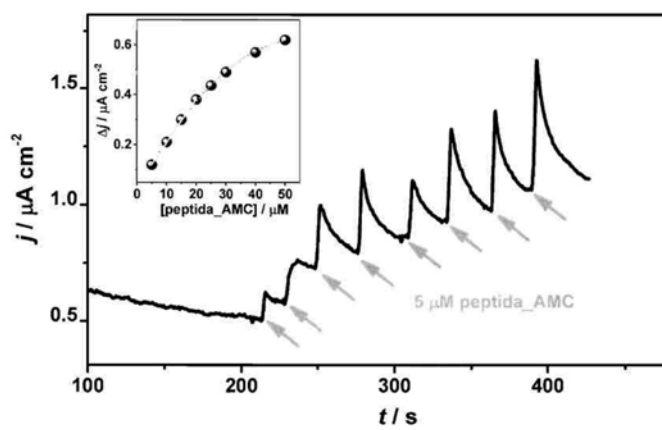
**G01N 27/327** (2006.01);

**G01N 33/48** (2006.01);

**C12Q 1/37** (2006.01)



**Fig. 1**



**Fig. 2**

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01);

G01N 33/48 (2006.01);

C12Q 1/37 (2006.01)

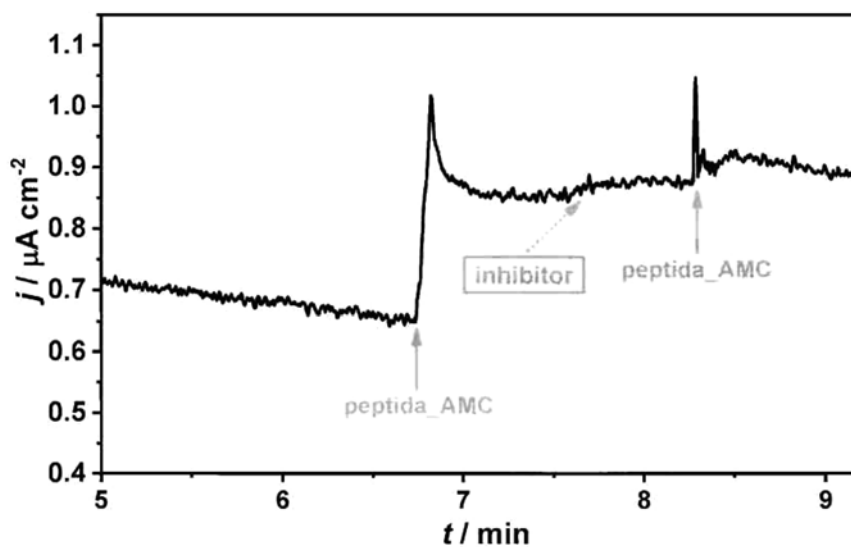


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 540/2022