



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2019 00885**

(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) **IMUNOSENZOR ELECTROCHIMIC PENTRU CUANTIFICARE
DE PROTEAZOM CIRCULATOR**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție a activității proteazomului circulator utilizată pentru analiza probelor biologice în vederea detecției precoce a unor afecțiuni de natură canceroasă. Metoda, conform invenției, utilizează un singur anticorp de detecție imobilizat pe electrod prin reticulare cu aldehidă glutarică în prezență de albumină serică bovină, marcat cu o enzimă fosfatază alcalină care transformă un substrat format din analitul de cuantificat cu activitate electrochimică redusă într-un

produs enzimatic cu activitate electrochimică ridicată și detecția prin voltametrie de undă pătrată în soluție de aminofenilfosfat pentru concentrații de 0,01, 0,10 și 1,00 mg; L⁻¹ proteazom c și 50 μM aminofenilfosfat.

Revendicări: 2

Figuri: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



24

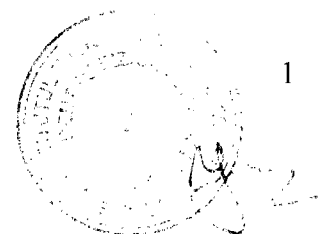
OFICIUL DE STAT PENTRU BREVETURI ȘI MARCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <u>a 2019</u> <u>885</u>
Data depozit <u>1.1.12.2019</u>

DESCRIERE

Prezenta invenție se referă la un imunosenzor cu detecție electrochimică pentru cuantificarea proteazomului circulator (*proteazom c*).

Proteazomul este un complex proteic enzimatic implicat în degradarea proteinelor lezionate/danificate. Degradarea se face de către subunitatea 20S a proteazomului [1], care prezintă o structură cilindrică inelară formată din 28 de subunități de tip α și β ; inelele exterioare din subunități de tip α formează o „poartă” de acces pentru proteine, în timp ce inelele interioare din subunități de tip β formând centru activ catalitic [2](Figura 1). O activitate atipică a proteazomului s-a observat atât la nivelul celulelor canceroase, unde acesta prezintă o activitate mai intensă [3], cât și în cazul bolilor neurodegenerative, unde există un cumul de proteine la nivelul neuronilor afectați, datorat unei inhibări a activității proteolitice a proteazomului de către proteinele cu defect de pliere, asociate acestor boli [4]. Proteazomul este localizat în cea mai mare parte la nivel intracelular în citoplasmă și nucleu, existând într-o mai mică măsură și în serul uman, acesta fiind denumit proteazom circulator (*proteazom c*). *Proteazomul c* a fost detectat în premieră prin teste de imunoabsorbție enzimatică (ELISA) în anul 1993 [5] și studii efectuate în ultimele două decenii au permis corelarea nivelului crescut al acestuia cu existența unor boli canceroase (leucemie, limfom, tumori maligne ale diverselor organe), boli ale ficatului (ciroza, hepatită cronică, ficatul gras) sau boli autoimune (miopatii inflamatorii idiopatice, lupusul eritematos sistemic) [6]. Principiul metodei de detecție utilizând testele ELISA se bazează pe reacția antigen-anticorp, unde anticorpul de captură este imobilizat pe un suport solid și permite detecția unei molecule de interes pentru care are specificitate. În mare parte, detecția este posibilă în urma marcării anticorpului cu o enzimă ce degradează un substrat cromogen, detectabil spectrofotometric la o lungime de undă corespunzătoare. Au fost raportate teste ELISA pentru detecția de *proteazom c* bazate pe trei anticorpi: un anticorp de captură, un anticorp de detecție și un al treilea anticorp marcat cu enzima peroxidază din hrean (HRP), ce permite detecția proteazomului prin cuantificarea spectrofotometrică la 450 nm a produsului de culoare albastră rezultat din reacția enzimatică a substratului cromogenic 3,3',5,5'- tetrametilbenzidinei cu HRP. Acest test a fost folosit cu succes în detecția de *proteazom c* de Majetschak et al. în cazuri de cardiopatie ischemică [7] și în afecțiuni pulmonare [8].

Recent, teste ELISA bazate pe această metodologie au fost disponibile comercial de către Enzo Life Sciences, Inc.. Aceste *kit*-uri au fost utilizate cu succes pentru detecție de *proteazom c*



în paciente însărcinate, ce prezentau preeclampsie și sindrom HELLP- hemoliză, nivel crescut al enzimelor hepatice și trombocitopenie [9].

Un alt *kit* de detecție a *proteazomului c* utilizează electro-chemiluminescența și este disponibil din punct de vedere comercial la MesoScale Discovery, Gaithersburg, MD, SUA. Asemănător testelor raportate în [7,8], sunt utilizați trei anticorpi, în cazul de față cel care permite cuantificarea fiind marcat astfel încât să genereze un semnal electro-chemiluminescent. Acest test a fost folosit pentru detecția carcinomului hepatocelular [10].

Un brevet pentru detecție de proteazom descrie utilizarea unor anticorpi disponibili comercial și utilizarea acestora în teste de imunoprecipitare sau teste ELISA, folosite pentru detecția precoce a mastitei la vaci [11].

Metoda de detecție a *proteazomului c* conform invenției pornește de la un imunosenzor electrochimic ce conține anticorpul de captură imobilizat pe electrod prin reticulare cu aldehydă glutarică în prezență de albumină bovină serică, și un sistem multistrat format din analitul de cuantificat, *proteazom c*, a cărui prezență la suprafața imunosenzorului este evidențiată electrochimic prin utilizarea unui singur anticorp de detecție marcat cu o enzimă care transformă un substrat inert electrochimic (sau cu o activitate electrochimică redusă) într-un produs enzimatic cu activitate electrochimică crescută.

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

- i) simplitatea fabricării imunosenzorului prin aceea că utilizează o tehnică de imobilizare a anticorpului de detecție simplă, prin reticulare cu aldehydă glutarică în prezență de albumină bovină serică;
- ii) simplitatea metodei de detecție prin aceea ce utilizează un singur anticorp de detecție marcat cu o enzimă care transformă un substrat inert electrochimic (sau cu o activitate electrochimică redusă) într-un produs enzimatic cu activitate electrochimică crescută;
- iii) utilizarea unei cantități infime de reagenți ceea ce reduce considerabil costurile aferente, substratul fix utilizat fiind un electrod de arie foarte mică;
- iv) limite de detecție mici datorate utilizării metodei de detecție electrochimice, comparativ cu cele obținute prin metoda clasică spectrofotometrică [12], făcând astfel metoda de detecție conform invenției mai adecvată pentru analiza probelor biologice;

- v) posibilitatea efectuării de măsurători în centre de colectare, datorat timpului scurt necesar analizei și a transportării și manevrării facile a sistemului de detecție, ținând cont că sunt necesare: imunosenzorul, un potențostat de dimensiuni mici, portabil și controlabil printr-un laptop.

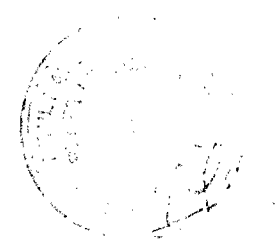
Se dă în continuare un exemplu de realizarea a invenției, în legătură cu figurile 1-3 ce reprezintă:

- Figura 1. Reprezentare schematică a metodei de detecție a *proteazomului c* bazată pe anticorpul de captură specific subunității β și cel de detecție, nespecific policlonal, conjugat cu fosfatază alcalină.
- Figura 2. (A) Detecție electrochimică prin voltametrie de undă pătrată cu enzima fosfatază alcalină conjugată cu anticorpul de detecție într-o soluție de aminofenilfosfat la diferiți timpi de incubare și (B) dependența lineară a intensității curentului de pic anodic cu timpul de incubare.
- Figura 3. Detecție electrochimică (A) a substratului enzimatic aminofenilfosfat și (B) a *proteazomului c*, prin voltametrie de undă pătrată utilizând imunosenzorul și metoda de detecție conform invenției.

Figura 1 ilustrează schematic construirea imunosenzorului bazat pe un sistem multistrat cu doi anticorpi: i) un anticorp primar de captură specific subunității β , și ii) un anticorp secundar de detecție policlonal polispecific, conjugat cu enzima fosfatază alcalină. Anticorpii utilizați pentru dezvoltarea prezentului imunosenzor sunt aleși astfel încât să permită detecția unei cantități cât mai mici de proteazom *c*. Astfel, alegerea anticorpului de captură se face în urma unor studii preliminare care au indicat o conservare a structurii 3D a *proteazomului c* în urma interacțiunii acestuia cu anticorpul specific subunității β . Anticorpul de detecție este unul policlonal care asigură interacțiunea cu *proteazomul c*, indiferent de structura conformațională adoptată de acesta în urma interacțiunii cu anticorpul de captură.

Imobilizarea anticorpului de captură se realizează prin reticulare cu aldehidă glutarică în prezență de albumină bovină serică. Electrocul astfel modificat este lăsat la temperatura camerei timp de 3 ore. Detecția *proteazomului c* se realizează în doi pași: i) incubarea imunosenzorului în soluția ce conține *proteazom c* urmat de; ii) atașarea anticorpului de detecție marcat cu fosfatază alcalină.

Figura 2 A și B se referă la activitatea enzimei fosfatază alcalină conjugată cu anticorpul de detecție. Evaluarea activității enzimei fosfatază alcalină conjugată cu anticorpului de detecție,



se realizează prin măsurători de voltametrie de unda pătrată în soluție de aminofenilfosfat prin monitorizarea apariției semnalului de oxidare al aminofenolului (**Figura 2A**). Se observă o creștere lineară a intensității de curent la +0.15 V vs. Ag/AgCl (**Figura 2B**), datorat oxidării produsului enzimatic aminofenol.

Figura 3A reprezintă răspunsul imunosenzorului la concentrații crescânde de aminofenilfosfat, observându-se o dependență lineară a intensității de pic anodic la +0.15 V vs. Ag/AgCl cu concentrația de substrat enzimatic.

Figura 3B exemplifică cuantificarea electrochimică de *proteazom c* prin voltametrie de unda pătrată utilizând imunosenzorul și metoda de detecție conform invenției, pentru concentrații de 0.01, 0.10 și 1.00 mg mL⁻¹ de *proteazom c* și 50 μM aminofenilfosfat.

REVENDICĂRI:

1. Procedeu de fabricare al unui imunosenzor pentru detecția electrochimică de *proteazom c* caracterizat prin aceea că se utilizează o tehnica de imobilizare a anticorpului de detecție prin reticulare cu aldehida glutarică în prezență de albumină bovină serică.
2. Procedeu de detecție electrochimică a *proteazomului c* utilizând imunosenzorul electrochimic obținut în revendicarea 1, și un sistem multistrat format din analitul de cuantificat, *proteazom c*, a cărui prezență la suprafața imunosenzorului este evidențiată electrochimic prin utilizarea unui singur anticorp de detecție marcat cu o enzimă care transformă un substrat inert electrochimic (sau cu o activitate electrochimică redusă) într-un produs enzimatic cu activitate electrochimică crescută.



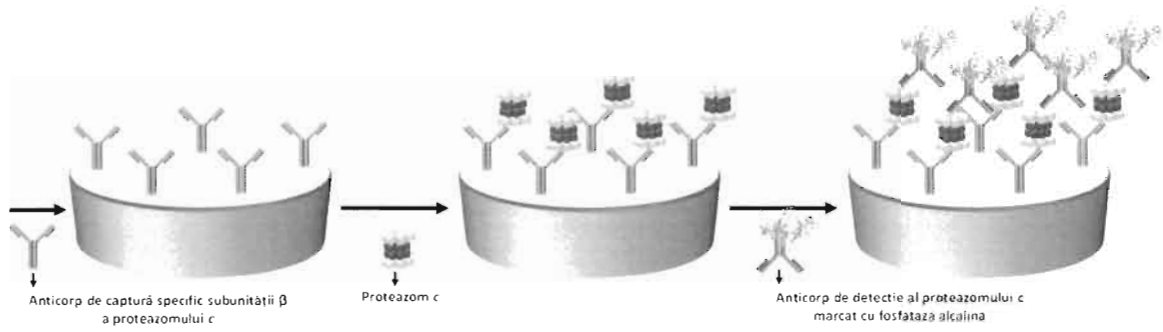


Figura 1.

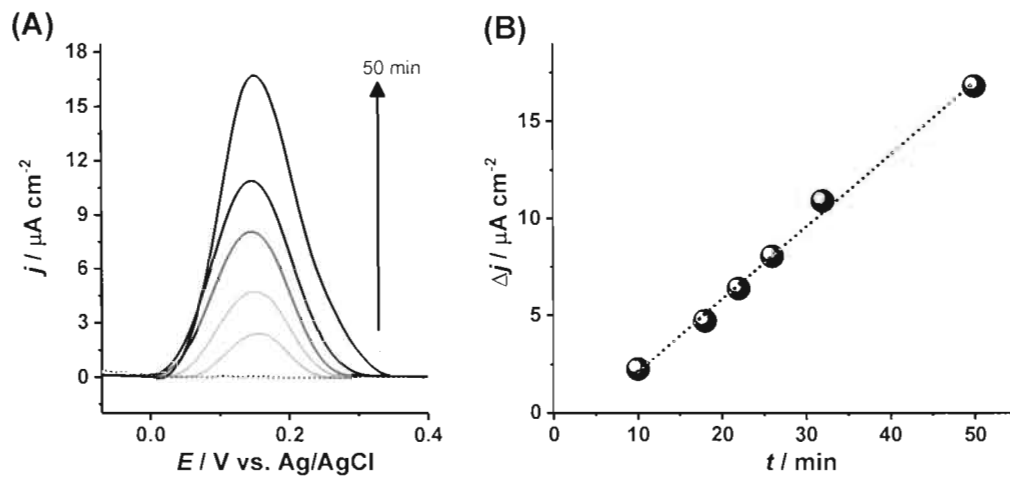


Figura 2.

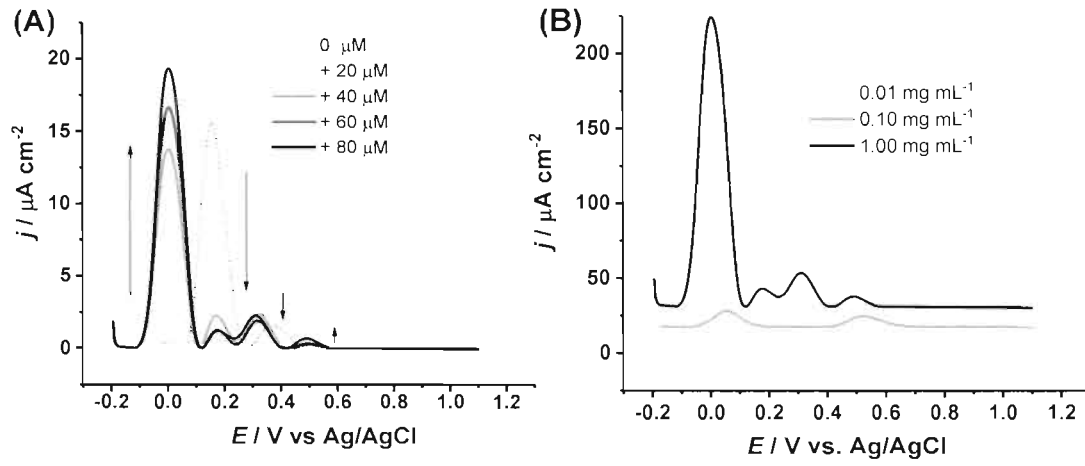


Figura 3.



8

[Handwritten signature]