



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

- (21) Nr. cerere: **a 2019 00885**  
(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:  
**US 8183047 B2; F. MOLLARASOULI,  
S. KURBANOGLU AND S. OZKAN, "THE  
ROLE OF ELECTROCHEMICAL  
IMMUNOSENSORS IN CLINICAL  
ANALYSIS", BIOSENSORS, NR. 9, VOL.  
86, 2019; BO QU, X. CHU, G. SHEN, R. YU,  
"A NOVEL ELECTROCHEMICAL  
IMMUNOSENSORS BASED ON  
COLABELED SILICA NANOPARTICLES  
FOR DETERMINATION OF TOTAL  
PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN IN  
HUMAN SERUM", VOL. 76, PP. 785-790,  
2008**

(54) **METODĂ DE DETECȚIE ELECTROCHIMICĂ  
A PROTEAZOMULUI CIRCULATOR**



# RO 134570 B1

1            Prezenta invenție se referă la o metodă de detecție electrochimică a *proteazomului*  
circulator (*proteazomul c*).

3            Proteazomul este un complex proteic enzimatic implicat în degradarea proteinelor  
lezionate/danificate. Degradarea se face de către subunitatea 20S a proteazomului [1], care  
5            prezintă o structură cilindrică inelară formată din 28 de subunități de tip  $\alpha$  și  $\beta$ ; inelele exte-  
rioare din subunități de tip formează o „poartă” de acces pentru proteine, în timp ce inelele  
7            interioare din subunități de tip  $\beta$  formând centru activ catalitic [2] (fig. 1). O activitate atipică  
a proteazomului s-a observat atât la nivelul celulelor canceroase, unde acesta prezintă o  
9            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 pro-  
11            teazomului 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  
13            mai mică măsură și în serul uman, acesta fiind denumit *proteazomul circulator (proteazomul*  
*c)*. *Proteazomul c* a fost detectat în premieră prin teste de imunoabsorbție enzimatică  
15            (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  
17            maligne ale diverselor organe), boli ale ficatului (ciroza, hepatită cronică, ficatul gras) sau boli  
autoimune (miopatii inflamatorii idiopatice, lupusul eritematos sistemic) [6]. Principiul metodei  
19            de detecție utilizând testele ELISA se bazează pe reacția antigen-anticorp, unde anticorpul  
de captură este immobilizat pe un suport solid și permite detecția unei molecule de interes  
21            pentru care are specificitate. În mare parte, detecția este posibilă în urma marcării anti-  
corpului cu o enzimă ce degradează un substrat cromogen, detectabil spectrofotometric la  
23            o lungime de undă corespunzătoare. Au fost raportate teste ELISA pentru detecția de  
*proteazomul c* bazate pe trei anticorpi: un anticorp de captură, un anticorp de detecție și un  
25            al treilea anticorp marcat cu enzima peroxidază din hrean (HRP), ce permite detecția pro-  
teazomului prin cuantificarea spectrofotometrică la 450 nm a produsului de culoare albastră  
27            rezultat din reacția enzimatică a substratului cromogenic 3,3',5,5'-tetrametilbenzidinei cu  
HRP. Acest test a fost folosit cu succes în detecția *deproteazomul c* de Majetschak et al. În  
29            cazuri de cardiopatie ischemică [7] și în afecțiuni pulmonare [8].

31            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-  
33            hemoliză, nivel crescut al enzimelor hepatice și trombocitopenie [9].

35            Un alt kit de detecție a *proteazomului c* utilizează electro-chemiluminescență 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  
37            permite cuantificarea fiind marcat astfel încât să genereze un semnal electro-  
chemiluminescent. Acest test a fost folosit pentru detecția carcinomului hepatocelular [10].

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

43            Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a detecta *proteazomul circulator*.  
Invenția se referă la o metodă de detecție electrochimică a *proteazomului c* în care:  
- se incubează consecutiv un imunosenzor constituit dintr-un electrod pe a cărui  
45            suprafață se află immobilizat un anticorp de captură specific *proteazomului c* prin reticulare cu  
aldehidă glutarică, în prezență de albumină serică bovină, într-o soluție care poate conține  
47            *proteazom c*, care se atașează de anticorpul de captură, urmată de o soluție a unui anticorp

de detecție a <i>proteazomului c</i> nespecific policlonal conjugat cu fosfatază alcalină, care se va atașa la <i>proteazom c</i> , și de o soluție de 4-aminofenilfosfat ca substrat enzimatic inert sau cu activitate electrochimică redusă la +0,15 V vs Ag/AgCl;	1
- se cuantifică concentrația de <i>proteazom c</i> în funcție de concentrația de aminofenol ca produs al reacției catalizate de fosfatază alcalină pornind de la 4-aminofenilfosfat ca substrat, aminofenolul fiind detectabil electrochimic la +0,15 V vs Ag/AgCl.	3
Avantajele cheie aduse de prezenta metodă și care rezolvă problemele critice ale metodelor deja existente de detecție a <i>proteazomului c</i> sunt:	5
i) simplitatea fabricării imunosenzorului prin aceea că utilizează o tehnică de imobilizare a anticorpului de detecție simplă, prin reticulare cu aldehidă glutarică în prezență de albumină bovină serică;	7
ii) simplitatea metodei de detecție prin aceea că 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;	9
iii) utilizarea unei cantități infime de regenți ceea ce reduce considerabil costurile aferente, substratul fix utilizat fiind un electrod de arie foarte mică;	11
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;	13
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.	15
Metoda de detecție a <i>proteazomului c</i> conform invenției pornește de la un imunosenzor electrochimic ce conține anticorpul de captură imobilizat pe electrod (unde electrodul de lucru reprezintă orice material conductor sau semiconductor necontaminat sau curățat prin procedee chimice și mecanice) prin reticulare cu aldehidă glutarică în prezență de albumină bovină serică, și un sistem multistrat format din analitul de cuantificat, <i>proteazom c</i> , 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.	17
Se dă în continuare un exemplu de realizarea a invenției, în legătură cu fig. 1...3 ce reprezintă:	19
- fig. 1, reprezentare schematică a imunosenzorului pentru detecția electrochimică de <i>proteazom c</i> bazat pe anticorpul de captură specific subunității $\beta$ și pe cel de detecție, nespecific policlonal, conjugat cu fosfatază alcalină;	21
- fig. 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;	23
- fig. 3, exemplu de aplicare a procedurii de detecție electrochimică a <i>proteazomului c</i> utilizând imunosenzorul electrochimic din fig. 1. Detecție prin voltametrie de undă pătrată: (A) a substratului enzimatic aminofenilfosfat, la concentrație fixă de <i>proteazom c</i> și (B) a <i>proteazomului c</i> , la concentrație fixă de aminofenilfosfat.	25
Fig. 1, ilustrează schematic construirea imunosenzorului bazat pe un sistem multistrat cu doi anticorpi: i) un anticorp de captură specific subunității $\beta$ , și ii) un anticorp secundar de detecție policlonal polispecific, conjugat cu enzima fosfatază alcalină. Anticorpii utilizați	27

1 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  
3 unor studii preliminare care au indicat o conservare a structurii 3D a *proteazomului c* în urma  
interacțiunii acestuia cu anticorpul specific subunității  $\beta$ . Anticorpul de detecție este unul  
5 policlonal care asigură interacțiunea cu *proteazomul c*, indiferent de structura conformațională  
adoptată de acesta în urma interacțiunii cu anticorpul de captură.

7 Imobilizarea anticorpului de captură se realizează prin reticulare cu aldehidă glutarică  
în prezență de albumină bovină serică. Electrocul astfel modificat este lăsat la temperatura  
9 camerei timp de 3 h. Detecția *proteazomului c* se realizează în doi pași: i) incubarea  
imunosenzorului în soluția ce conține *proteazomul c* (fie aceasta o soluție standard de  
11 concentrație cunoscută sau o probă de ser de concentrație necunoscută) urmat de; ii)  
atașarea anticorpului de detecție marcat cu fosfatază alcalină.

13 Fig. 2 A și B se referă la activitatea enzimei fosfatază alcalină conjugată cu anticorpul  
de detecție. Evaluarea activității enzimei fosfatază alcalină conjugată cu anticorpul de  
15 detecție, se realizează prin măsurători de voltametrie de undă pătrată în soluție de amino-  
fenilfosfat prin monitorizarea apariției semnalului de oxidare al aminofenolului (fig. 2A). Se  
17 observă o creștere lineară a intensității de curent la +0,15 V vs. Ag/AgCl (fig. 2B), datorat  
oxidării produsului enzimatic aminofenol.

19 Fig. 3A, reprezintă răspunsul imunosenzorului la concentrații crescânde de amino-  
fenilfosfat, observându-se o dependență lineară a intensității de pic anodic la +0,15 V vs.  
21 Ag/AgCl cu concentrația de substrat enzimatic.

Fig. 3B, exemplifică cuantificarea electrochimică de *proteazomul c* prin voltametrie  
23 de undă pătrată utilizând imunosenzorul și metoda de detecție conform invenției, pentru  
concentrații de 0,01, 0,10 și 1,00 mg mL<sup>-1</sup> de *proteazom c* și 50  $\mu$ M aminofenilfosfat. Aplica-  
25 bilitatea imunosenzorului în probe reale se realizează utilizând curba de calibrare obținută  
în concentrații standard de proteazom, prin tehnica regresiei lineare.

## 27 Bibliografie

29 [1] A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway*, Cell. 79 (1994),  
31 13-21. doi: 10.1016/0092-8674(94)90396-4.

[2] E. Kish-Trier, CP. Hill, *Structural biology of the proteasome*, Annu Rev Biophys. 42,  
33 (2013), 29-49. doi: 10.1146/annurev-biophys-083012-130417.

[3] A. Mani, E.P. Gelmann, *The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer*,  
35 J. Clin. Oncol. 23 (2005) 4776-4789. doi: 10.1200/JCO.2005.05.081.

[4] N. P. Dantuma, L. C. Bott, *The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative*  
37 *diseases: Precipitating factor, yet part of the solution*, Front. Mol. Neurosci. 7 (2014).  
doi:10.3389/fnmol.2014.00070.

[5] M. Wada, M. Kosaka, S. Saito, T. Sano, K. Tanaka, A. Ichihara, *Serum*  
39 *concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic*  
41 *malignancy and their pathophysiologic significance*, J. Lab. Clin. Med. 121 (1993), 215-23.

[6] S. U. Sixt, B. Dahlmann, *Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin -*  
43 *Incidence and relevance*, Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis., 1782, (2008), 817-823.  
doi:10.1016/j.bbdis.2008.06.005.

[7] M. Majetschak, M.B. Patel, L.T. Sorell, C. Liotta, S. Li, S.M. Pham, *Cardiac*  
45 *proteasome dysfunction during cold ischemic storage and reperfusion in a murine heart*  
47 *transplantation model*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 365, (2008), 882-888,  
doi:10.1016/j.bbrc.2007.11.092.

## RO 134570 B1

- [8] M. Majetschak, L.T. Sorell, T. Patricelli, D.H. Seitz, M.W. Knoferl, *Detection and possible role of proteasomes in the bronchoalveolar space of the injured lung*, *Physiol. Res.*, 58, (2009), 363-372. 1  
3
- [9] K. Berryman, C.S. Buhimschi, G. Zhao, M. Axe, M. Locke, LA. Buhimschi, *Proteasome levels and activity in pregnancies complicated by severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and thrombocytopenia (HELLP) syndrome*, *Hypertens.*, 73, (2019), 1308-1318. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12437. 5  
7
- [10] K.Z. Qu, K. Zhang, W. Ma, H. Li, X. Wang, X. Zhang, F. Giles, M. Lai, N.H. Afdhal, M. Albitar, *Ubiquitin-proteasome profiling for enhanced detection of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease*, *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 26, (2011), 751-758. doi: 10.1111/lj. 1440-1746.2010.06491.x. 9  
11
- [11] K. Madura, *Methods of detecting mastitis by levels of proteasomes*, US 8183047 B2, 2012. 13
- [12] H. Sha, Y. Bai, S. Li, X. Wang, Y. Yin, *Comparison between electrochemical ELISA and spectrophotometric ELISA for the detection of dentine sialophosphoprotein for root resorption*, *Am. J. Orthod. Dentofac. Otthop.* 145 (2014) 36-40. doi:10.1016/j.ajodo. 2013.09.008. 15  
17

# RO 134570 B1

1

## Revendicare

3

Metodă de detecție electrochimică a *proteazomului c*, caracterizată prin aceea că:

5

- se incubează consecutiv un imunosenzor constituit dintr-un electrod pe a cărui suprafață se află imobilizat un anticorp de captură specific *proteazomului c* prin reticulare cu aldehidă glutarică, în prezență de albumină serică bovină, într-o soluție care poate conține *proteazom c*, care se atașează de anticorpul de captură, urmată de o soluție a unui anticorp de detecție a *proteazomului c* nespecific policlonal conjugat cu fosfatază alcalină, care se va atașa la *proteazom c*, și de o soluție de 4-aminofenilfosfat ca substrat enzimatic inert sau cu activitate electrochimică redusă la +0,15 V vs Ag/AgCl;

7

9

11

- se cuantifică concentrația de *proteazom c* în funcție de concentrația de aminofenol ca produs al reacției catalizate de fosfatază alcalină pornind de la 4-aminofenilfosfat ca substrat, aminofenolul fiind detectabil electrochimic la +0,15 V vs Ag/AgCl.

13

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01);

G01N 33/53 (2006.01);

C12Q 1/42 (2006.01)

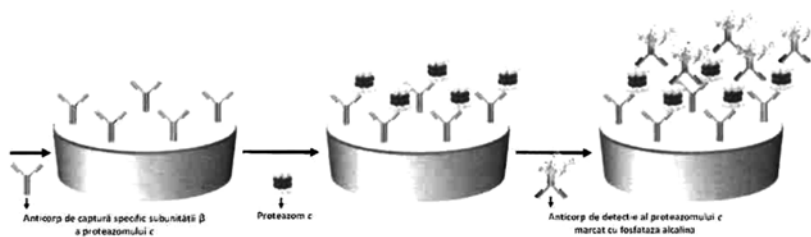


Fig. 1

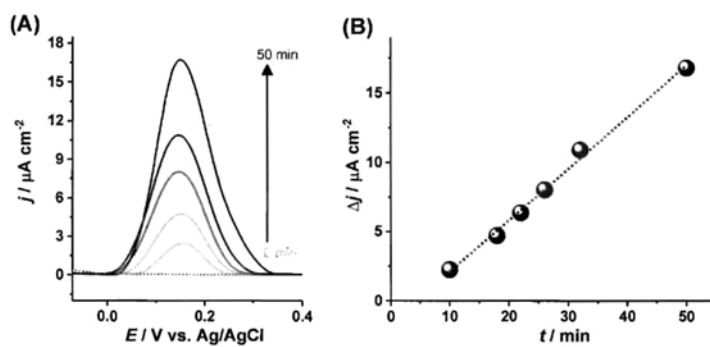


Fig. 2

(51) Int.Cl.

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

**G01N 33/53** (2006.01);

**C12Q 1/42** (2006.01)

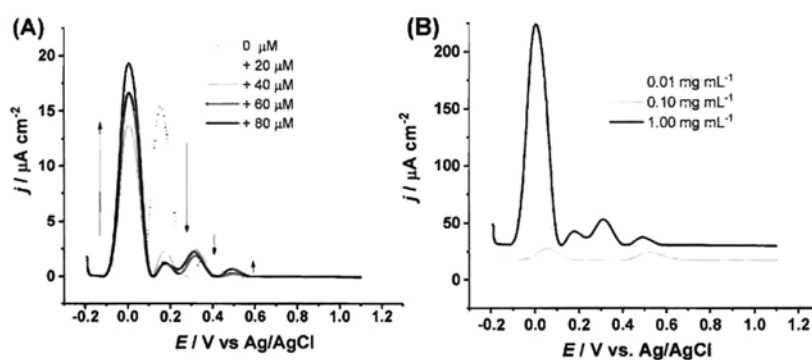


Fig. 3



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
 Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
 sub comanda nr. 541/2022