



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2020 00735**

(22) Data de depozit: **16/11/2020**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2023** BOPI nr. **5/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2021 BOPI nr. **6/2021**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
FIZICA MATERIALELOR,**
*STR. ATOMIȘTILOR NR. 405A,
MĂGURELE, IF, RO;*
• **PRO-VITAM S.R.L.,**
*STR. MUNCITORILOR, NR.16,
SFÂNTU GHEORGHE, CV, RO*

(72) Inventatori:
• **DINESCU MONICA,**
*STR.MONUMENTULUI, NR.6B, BL.2, ET.4,
AP.39, BRAGADIRU, IF, RO;*
• **UDRESCU ADELINA, SAT BAIA DE FIER,**
NR.215, COMUNA BAIA DE FIER, GJ, RO;

• **BAIBARAC MIHAELA, ALEEA BARAJUL
DUNĂRII, NR.1, BL.M35, SC.5, ET.10,
AP.217, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **FEJER SZILARD, STR. PETOFI SANDOR,**
*NR.26, BL.47, AP.3, TG. SECUIESC, CV,
RO*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**M. BAIBARAC, M. DAESCU, M. SOCOL,
C. BARTHA, C. NEGRILĂ ȘI S. N. FEJER,**
**"INFLUENCE OF REDUCED GRAPHENE
OXIDE ON THE
ELECTROPOLYMERIZATION OF
5-AMINO-1-NAPHTOL AND THE
INTERACTION OF 1,4-PHENYLENE
DIISOTHIOCYANATE WITH THE POLY
(5-AMINO- 1-NAPHTOL)/REDUCED
GRAPHENE OXIDE COMPOSITE",
POLYMERS, NR. 6, VOL. 12, 2020;
US 2020/0319202 A1**

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI SENZOR
PENTRU DETECȚIA ELECTROCHIMICĂ A RECEPTORULUI
FACTORULUI DE CREȘTERE EPIDERMAL**



1 Invenția se referă la un procedeu de asamblare a unei platforme senzoriale care să
2 permită detecția electrochimică a receptorului factorului de creștere epidermal în tumorile
3 cerebrale și care să implice nanostructuri cu preț de cost sub cel al imunosenzorilor utilizați
4 în prezent.

5 Principalele platforme senzoriale pentru detecția electrochimică a receptorului
6 factorului de creștere epidermal (abreviat EGFR) raportate până în prezent sunt bazate pe:
7 I) nanoparticule de aur [Z. Altintas, S.S. Kallempudi, Y. Gurbuz, *Gold nanoparticle
8 modified capacitive sensor platform for multiple marker detection*, *Talanta* 118, 270-
9 276, 2014; R. Elshafey, A.C. Tavares, M. Siaj, M. Zourob, *Electrochemical impedance
10 immunosensor based on gold nanoparticles -protein G for the detection of cancer
11 marker epidermal growth factor receptor in human plasma and brain tissue*,
12 *Biosensors and Bioelectronics* 50, 143-149, 2013]; II) electrozi de Au modificați cu peptide
13 [R. Li, H. Huang, L. Huang, Z. Lin, L. Guo, B. Qiu, G. Chen, *Electrochemical biosensors
14 for epidermal growth factor receptor detection with peptide ligand*, *Electrochimică
15 Acta* 109, 233-237, 2013; H. Ilkhani, M. Sarparast, A. Noori, S. Z. Bathaie, M.F. Mousavi,
16 *Electrochemical aptamer/antibody based sandwich immunosensor for the detection
17 of EGFR, a cancer biomarker, using gold nanoparticles as a signaling probe*,
18 *Biosensors and Bioelectronic* 74, 491-497, 2015] și III) nanocompozite de tip Fe₃O₄/N-
19 trimetil chitosan/nanoparticule de Au [K. Omidfar, M. Darzianiazizi, A. Ahmadi, M.
20 Daneshpour, H. Shirazi, *Sensors and Actuators B* 220, 1311-1319, 2015].

21 Principalul dezavantaj al aplicării acestor procedee constau în: I) costul mare al
22 electrozilor de aur; II) controlul riguros al dimensiunii nanoparticulelor de aur și
23 monodispersiei acestora, și III) procesele de agregare/aglomerare a nanoparticulelor de aur.

24 În prezent, senzorii cei mai utilizați pentru diagnosticul medical sunt aceia bazați pe
25 electrozi serigrafiați. În acest context, un exemplu este senzorul electrochimic serigrafiat pe
26 bază de polimeri imprimați moleculari pentru determinarea factorilor neurotrofici, de exemplu
27 a factorului de creștere epidermală, din probe lichide [US2020/0319202 A1 (8.10.2020),
28 *Molecular Imprinted Polymer Sensors for Neurotrophic factors*, V. Soritski, J. Reut, A.
29 Kidakova, A. Optik, Tallinn University of Technology, [0059]]. Conform cererii de brevet
30 US 2020/0319202 A1 (8.10.2020), acest senzor conține cel puțin un electrod electrochimic
31 [0090] a cărui suprafață poate fi din oxid redus de grafenă [0073]. Metoda de preparare a
32 stratului de polimeri imprimați moleculari a implicat: I) formarea unui strat de legare pe
33 suprafața electrodului serigrafiat [0124], care se poate scinda, de exemplu conducând la for-
34 marea a unui monostrat de 4-aminotiofenol, II) formarea unui monostrat de 3, 3'-dithio-
35 bis(sulfosuccinimida-propionat) legat covalent de monostratul de 4-aminotiofenol; III) imo-
36 bilizarea de molecule de factor neurotrofic pe stratul de legare scindabil; IV) polimerizarea
37 m-fenilendiaminei pe suprafața pe care este imobilizat factorul neurotrofic, rezultând un strat
38 polimeric, care acoperă suprafața respectivă și blochează moleculele de factor neurotrofic.

39 Problema tehnică care este avută în vedere a fi rezolvată prin prezenta invenție
40 constă în elaborarea unui procedeu de obținere a unui senzor bazat pe un electrod
41 serigrafiat modificat cu oxid de grafenă pentru detecția electrochimică a receptorului
42 factorului de creștere epidermal.

43 În vederea înlăturării dezavantajelor menționate mai sus, o soluție alternativă este
44 utilizarea electrozilor serigrafiați modificați cu oxid de grafenă care sunt funcționalizați ele-
45 ctrochimic cu polimeri conjugați. Procedeu de funcționalizare electrochimică a electrozilor
46 serigrafiați modificați cu oxid de grafenă în stare redusă cu polimerul conjugat poli(5-amino-
47 1-naftol) implică generarea a noi legături covalente între cei doi compuși constituenți

[M. Baibarac, M. Daescu, M. Socol, C. Bartha, C. Negrila, S. N. Fejer, <i>Influence of reduced graphene oxide on the electropolymerization of 5-amino-1-naphthol and the interaction of 1, 4-phenylene diisothiocyanate with the poly(5-amino-1-naphthol)/reduced graphene oxide composites</i> , <i>Polymers</i> 12 , 1299, 2020]. În comparație cu electrozii de mai sus, electrozii serigrafiați modificați cu oxid de grafenă funcționalizați electrochimic cu poli(5-amino-1-naftol) prezintă o structură moleculară conform fig. 1, care va prezenta un număr crescut de grupări hidroxil pe suprafața stratului de oxid de grafenă. Procesul de funcționalizare electrochimică a electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă implică polimerizarea electrochimică a 5-amino-1-naftolului în soluții apoase acide folosind ca metodă voltametria ciclică. Folosirea unor parametri bine definiți precum domeniul de potențial, viteza de scanare a potențialului și numărul de cicluri conduce la obținerea unor electrozi înalt reproductibili, care prin interacții chimice succesive vor permite o asamblare conform etapelor menționate mai jos în vederea detecției electrochimice a EGFR.	1 3 5 7 9 11 13
În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției în legătură și cu fig. 1...5.	15
- fig. 1, structura chimică a electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă funcționalizat electrochimic cu poli(5-amino-1-naftol);	17
- fig. 2, interacția electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă funcționalizat electrochimic cu poli(5-amino-1-naftol) cu 1,4-fenilen diizotiocianat (abreviat PDITC),	19
- fig. 3, interacția electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/ poli(5-amino-1-naftol)-1,4-fenilen diizotiocianat cu proteina G;	21
- fig. 4, interacția electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) -1,4-fenilen diizotiocianat -proteina G cu anticorpii EGFR (abreviat anti-EGFR);	23
- fig. 5, interacția electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) -1,4-fenilen diizotiocianat -proteina G - anti-corpi EGFR cu EGFR.	25
Procedeul de obținere a unui senzor bazat pe un electrod serigrafiat modificat cu oxid de grafenă pentru detecția electrochimică a receptorului factorului de creștere epidermal constă în următoarele etape:	27 29
- funcționalizarea cu poli(5-amino-1-naftol) a unui electrod serigrafiat modificat cu oxid de grafenă prin polimerizarea electrochimică a 5-amino-1-naftolului având concentrația de 0,01M în prezența unei soluții acide (exemplu acid sulfuric, acid clorhidric etc. având concentrația 0,1M) în domeniul de potențial (0; + 950) mV vs. Ag cu viteza de 50 mV/s, prin înregistrarea a 5 voltamograme ciclice cu oprirea la potențialul de +950 mV. Acest proces implică o adsorbție chimică a poli(5-amino-1-naftol) pe suprafața electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă (fig. 1).	31 33 35
- interacția chimică a electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) cu 1,4-fenilen-diizotiocianat (abreviat PDITC), când rezultă produsul de reacție oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) - 1,4-fenilen-diizotiocianat (fig. 2);	37 39
- interacția electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) -1,4-fenilen-diizotiocianat cu proteina G și atașarea covalentă a acesteia pe suprafața electrodului modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) - 1,4-fenilen-diizotiocianat (fig. 3);	41 43
- interacția electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) - 1,4-fenilen-diizotiocianat - Proteina G cu anticorpi EGFR conducând la o structură asamblată de tip electrod serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) - 1,4-fenilen-diizotiocianat - Proteina G - anticorpi EGFR (fig. 4). Electrodul serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) - 1,4-fenilen-diizotiocianat - Proteina G - anticorpi EGFR va reacționa chimic cu EGFR conform fig. 5.	45 47 49

RO 135085 B1

- 1 Platforma senzorială bazată pe electrozi serigrafiați modificați cu oxid de grafenă și poli(5-amino-1-naftol) conform invenției prezintă următoarele avantaje:
- 3 - funcționalizat electrochimic cu poli(5-amino-1-naftol), electrodul serigrafiat modificat cu oxid de grafenă prezintă o reproductibilitate ridicată, straturile de oxid de grafenă fiind
- 5 funcționalizate covalent atât cu grupări hidroxil cât și cu lanțurile macromoleculare ale poli(5-amino-1-naftol);
- 7 - utilizând electrozi serigrafiați modificați cu oxid de grafenă/ poli(5-amino-1-naftol) se asigură o asamblare reproductibilă a senzorilor pentru detecția EGFR;
- 9 - costul mai mic al unui astfel de senzor va reduce costurile aferente efectuării analizei.

RO 135085 B1

Revendicare

1

Procedeu de obținere a unui senzor bazat pe un electrod serigrafiat modificat cu oxid de grafenă pentru detecția electrochimică a receptorului factorului de creștere epidermal, caracterizat prin aceea că , constă în următoarele etape:	3
- funcționalizarea cu poli(5-amino-1-naftol) a unui electrod serigrafiat modificat cu oxid de grafenă prin polimerizarea electrochimică a 5-amino-1-naftolului în soluție acidă, în domeniul de potențial (0; + 950) mV vs. Ag cu viteza de 50 mV/s, prin înregistrarea a 5 voltamograme ciclice cu oprirea la potențialul de +950 mV și adsorbție chimică a poli(5-amino-1-naftolului) rezultat pe suprafața electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă;	5
- interacția chimică a electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) cu 1,4-fenilen-diizotiocianat, când rezultă produsul de reacție oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) - 1,4-fenilen-diizotiocianat;	7
- interacția electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) -1,4-fenilen-diizotiocianat cu proteina G și atașarea covalentă a acesteia pe suprafața electrodului modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) - 1,4-fenilen-diizotiocianat;	9
- interacția electrodului serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) - 1,4-fenilen-diizotiocianat - Proteina G cu anticorpi EGFR conducând la o structură asamblată de tip electrod serigrafiat modificat cu oxid de grafenă/poli(5-amino-1-naftol) - 1,4-fenilen-diizotiocianat - Proteina G - anticorpi EGFR.	11
	13
	15
	17
	19

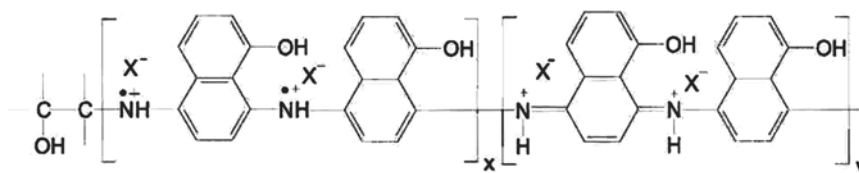


Fig. 1

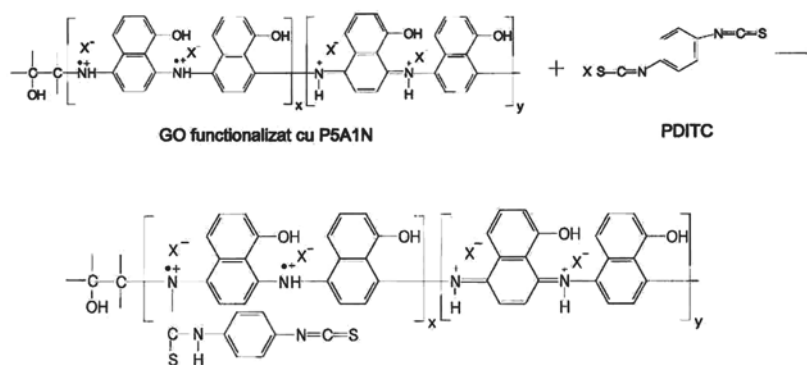


Fig. 2

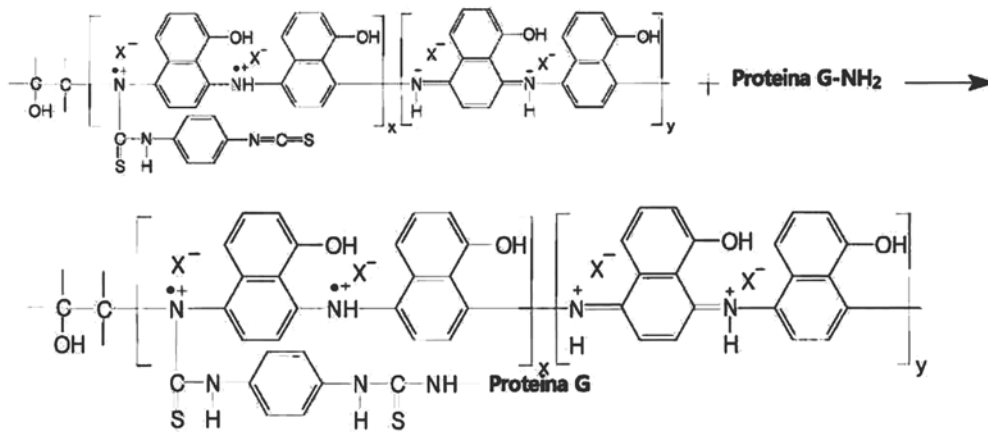


Fig. 3

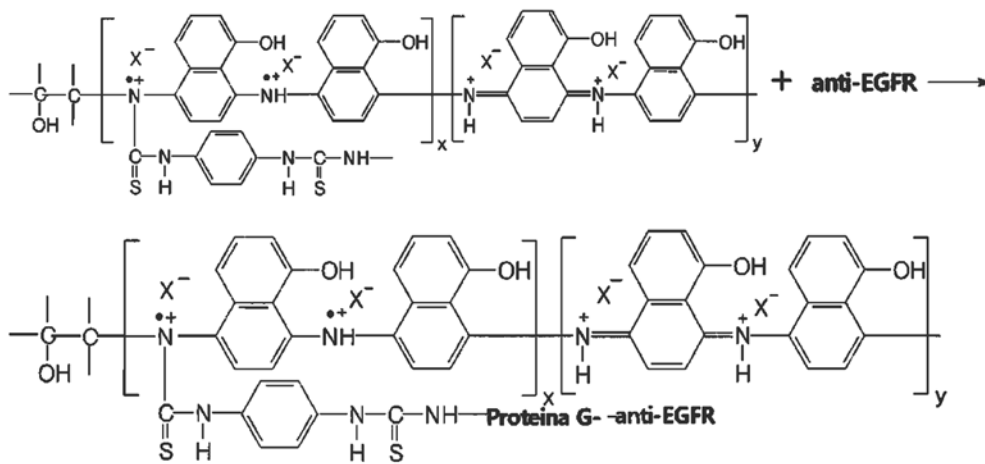


Fig. 4

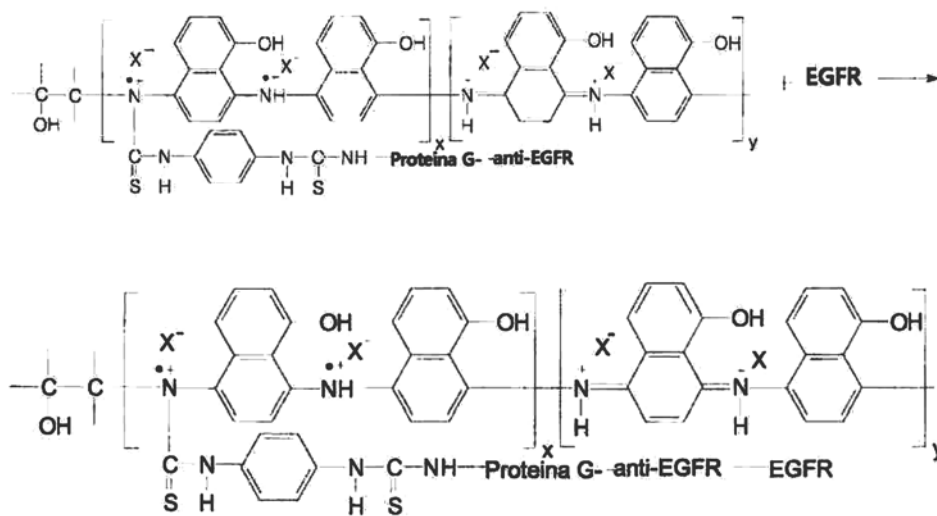


Fig. 5

