



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00103

(22) Data de depozit: 09/03/2021

(41) Data publicării cererii:  
30/09/2021 BOPI nr. 9/2021

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

(72) Inventatori:  
• DICULESCU VICTOR CONSTANTIN,  
STR.NERVA TRAIAN, NR.16, BL.M35, SC.3,  
ET.7, AP.88, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;  
• ENCULESCU MARIA-MONICA,  
STR.DESPINA DOAMNA NR.20,  
CURTEA DE ARGEȘ, AG, RO

(54) FIBRE ELECTROFILATE CU ACOPERIRE METALICĂ  
ȘI OLIGONUCLEOTIDE DE CATENĂ SIMPLĂ CU GRUPĂRI  
TIOFOSFAT CU APLICAȚII ÎN DOMENIUL BIOSENZORILOR  
ELECTROCHIMICI PENTRU DETECȚIA DE BIOMARKER-I

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor electrochimic pentru detecția unor (bio) molecule cu utilizare în domeniul diagnozei medicale. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de: realizare a unui electrod micro/nanostructurat din fibre polimerice electrofilate, acoperite cu strat de aur prin pulverizare în câmp magnetron și atașate termic pe substrat solid, imobilizarea pe suprafața electrodului a

elementului de bio-recunoaștere de tip oligonucleotide cu grupări funcționale tiofosfat care interacționează specific cu o anumită țintă biologică și înregistrarea de voltamograme sau spectre de impedanță electrochimică cu monitorizarea rezistenței la transfer de sarcină.

Revendicări: 4  
Figuri: 2



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <i>e 2021 00103</i>
Data depozit <i>09-03-2021</i>

Titlu

FIBRE ELECTROFILATE CU ACOPERIRE METALICĂ ȘI OLIGONUCLEOTIDE DE  
CATENĂ SIMPLĂ CU GRUPĂRI TIOFOSFAT CU APLICAȚII ÎN DOMENIUL  
BIOSENZORILOR ELECTROCHIMICI PENTRU DETECȚIA DE *BIOMARKER-I*

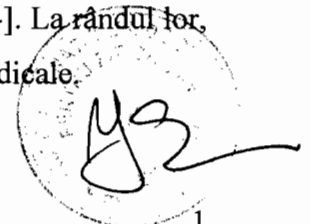
Autori

VICTOR CONSTANTIN DICULESCU, MARIA-MONICA ENCULESCU

## DESCRIERE

Prezenta invenție descrie un procedeu de obținere a unei platforme biosenzoriale cu ADN și cu detecție electrochimică, formată din: *i*) fibre electrofilate cu dimensiuni micro- și nano- metrice cu acoperire metalică și *ii*) secvențe de ADN ale căror catene conțin grupări tiofosfat. Conform invenției, platforma biosenzorială cu fibre electrofilate cu acoperire metalică și oligonucleotide de catenă simplă cu grupări tiofosfat prezintă aplicații în domeniul biosenzorilor electrochimici cu ADN utilizabili pentru detecția: *a*) mutațiilor genetice prin intermediul fenomenelor de hibridizare; și *b*) de alte (bio)molecule prin intermediul aptamerilor.

Un biosenzor este un dispozitiv format dintr-un transductor a cărui suprafață este modificată cu un bioelement/biomoleculă de recunoaștere [1,2]. Acizii nucleici (ADN și ARN) sunt utilizați ca elemente de bio-recunoaștere atât sub forma de catenă polinucleotidică simplă cât și sub forma de dublu helix. Cu referire strictă la acizii nucleici sub forma de catenă polinucleotidică simplă aceștia pot fi utilizați ca elemente de bio-recunoaștere pentru detecția: *a*) mutațiilor genetice prin intermediul fenomenelor de hibridizare între oligonucleotide (catene de ADN cu până la câteva zeci de baze azotate); și *b*) altor (bio)molecule prin intermediul fenomenelor de pliere specifică a aptamerilor. Mutațiile genetice reprezintă modificări ale secvenței de baze azotate ale ADN-ului unui organism ceea ce duce la perturbări ale proceselor de hibridizare cu secvențe complementare, în consecință la formarea unui dublu helix imperfect. Detecția mutațiilor genetice este de importanță extremă în domeniul diagnozei medicale [3]. Pe de alta parte, aptamerii ADN sunt oligonucleotide specific selectate pentru a interacționa cu mare afinitate cu (bio)molecula țintă, în general *biomarker-i* ai anomaliilor medicale, formând complecși macromoleculari extrem de stabili cu aceasta [4]. La rândul lor, detecția de *biomarker-i* este de importanță extremă în domeniul diagnozei medicale.



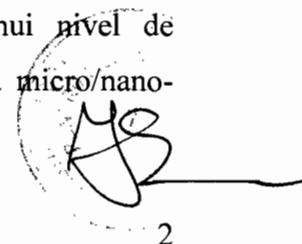
Principalul și cel mai important pas în dezvoltarea unui biosenzor este imobilizarea elementului de bio-recunoaștere la suprafața transductorului (electrodului, în cazul biosenzorilor cu detecție electrochimică) [5]. Există diferite proceduri pentru imobilizarea secvențelor de acizi nucleici la suprafața (semi)conductoare a electrozilor pentru obținerea unui biosenzor [6] la suprafața electrodului. Aceasta tehnica este simplă și nu necesită funcționalizarea prealabilă a suprafeței de electrod. De asemenea, imobilizarea covalentă poate fi obținută atât prin controlul chimic al suprafeței electrodului (funcționalizarea acestuia cu polimeri, dendrimeri sau straturi auto-asamblate de molecule cu terminații amino sau carboxil) sau prin modificarea secvenței de ADN cu grupări funcționale precum grupările tiol care permit formarea de legături covalente cu suprafețe metalice, în special cele de aur. Pe de altă parte, există strategii de imobilizare prin interacții de bioafinitate care, la rândul lor implică modificarea oligonucleotidei cu diverși compuși chimici. Acest tip de imobilizare asigură flexibilitatea și orientarea oligonucleotidei la suprafața electrodului. Cu toate acestea, se remarcă necesitatea de noi strategii de imobilizare care să răspundă cerințelor actuale rezultante din nevoia reducerii fenomenelor de adsorbție nespecifică a moleculelor țintă dar și a îmbunătățirii semnalelor asociate proceselor de detecție.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în îmbunătățirea metodelor de imobilizare a secvențelor de ADN, reducerea problemelor asociate fenomenelor de adsorbție ne-specifică, precum și îmbunătățirea semnalului asociat detecției.

Platforma senzorială cu ADN cu detecție electrochimică răspunde acestor necesități prin aceea că este constituită din:

- un transductor electrochimic (electrod) micro/nanostructurat obținut din fibre polimerice electrofilate, acoperite cu strat de aur prin pulverizare în câmp magnetron și atașate termic pe substrat solid;
- un strat de ADN sintetic, de secvență cunoscută, în a cărei compoziție se regăsesc grupările tiofosfat ce contribuie la adsorbția oligonucleotidei pe suprafața transductorului prin interacția atomilor de sulf cu cei de aur.

Platforma senzorială cu oligonucleotide cu grupări tiofosfat, conform invenției prezintă avantajul unor performanțe superioare pentru realizarea detecției și anume: stabilitate crescută, timp de răspuns rapid și costuri reduse. De asemenea, utilizarea transductorului electrochimic obținut din fibre polimerice electrofilate acoperite cu strat de aur pentru procedeul de imobilizare de oligonucleotide cu grupări tiofosfat, permite obținerea unui nivel de reproductibilitate superior macro-electrozilor, o sensibilitate crescută datorată micro/nano-



structurării suprafeței și evită necesitatea pașilor de pasivare a suprafeței de electrod datorită reducerii problemelor asociate fenomenelor de adsorbție ne-specifică.

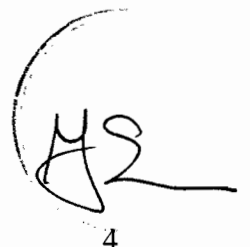
În cele ce urmează se prezintă două exemple de realizare a invenției, în legătură și cu figurile ce reprezintă:

- fig. 1a, schemă a oligonucleotidei cu grupări tiofosfat imobilizată pe suprafața electrodului și pașii necesari obținerii semnalului electrochimic;
- fig. 1b, obținerea semnalului electrochimic prin înregistrarea de voltamograme cu biosenzorul cu oligonucleotide cu grupări tiofosfat pe electrod obținut din fibre polimerice electrofilate, acoperite cu strat de aur prin pulverizare în câmp magnetron și atașate termic pe substrat solid;
- fig. 2a, schemă a aptamerului cu grupări tiofosfat imobilizat pe suprafața electrodului și pașii necesari obținerii semnalului electrochimic;
- fig. 2b, obținerea semnalului electrochimic prin înregistrarea de spectre de impedanță electrochimică cu biosenzorul cu aptamer cu grupări tiofosfat pe electrod obținut din fibre polimerice electrofilate, acoperite cu strat de aur prin pulverizare în câmp magnetron și atașate termic pe substrat solid.

Exemplul 1. Leucemia mieloidă cronică (LMC) este caracterizată prin fuziunea genei *ABL 1* de pe cromozomul 9 cu gena *BCR* de pe cromozomul 22. Rezultatul acestui proces este apariția genei *BCR/ABL*, respectiv a cromozomului Philadelphia, ce se regăsește în cazul a mai mult de 95% dintre pacienții diagnosticați cu LMC. Odată identificată zona de fuziune și respectiva secvență de ADN, aceasta poate fi replicată prin sinteză chimică/biochimică într-o oligonucleotidă cu grupări tiofosfat. Datorită interacției sulf-aur, oligonucleotida cu grupări tiofosfat este imobilizată la suprafața electrodului, într-o poziție paralelă cu aceasta, o configurație ce facilitează detecția electrochimică. Oligonucleotida specifică genei *BCR/ABL*, cu 26 de reziduuri din care 6 poziționate în zona centrală modificate cu grupări tiofosfat, este adsorbită pe suprafața electrodului obținut din fibre polimerice electrofilate acoperite cu strat de aur prin pulverizare în câmp magnetron și atașate termic pe substrat solid, astfel obținându-se biosenzorul cu oligonucleotidă cu grupări tiofosfat pentru detecția LCM. Zona de modificare cu grupări tiofosfat este aleasă astfel încât să încadreze zona mutației de interes. Biosenzorul este incubat în soluția de ADN țintă și apoi în cea de *indicator* electroactiv, fig. 1a. Procesul de detecție al formării unui duplex, complet sau parțial, este reliefat prin măsurători voltametrice în soluție tampon, fig. 1b. Formarea unui duplex complet se evidențiază prin curenți redox de intensități mai mari (curba neagră) decât în cazul incubării în soluție de secvență parțial complementară, deci a formării unui duplex parțial (curba punctată), sau în

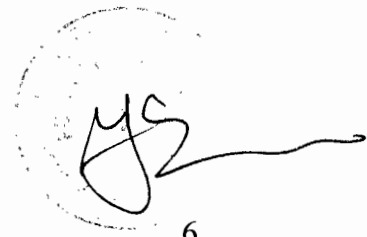
cazul incubării în soluție de secvență necomplementară, ceea ce nu duce la formarea unui duplex (curba gri).

Exemplul 2. Trombina este o proteină cu funcție duală acționând atât ca pro-coagulant cât și ca anti-coagulant reprezentând în același timp un *biomarker* pentru diagnosticarea unor anomalii medicale. Detecția trombinei devine astfel importantă pentru diagnoza medicală. Un aptamer ADN este o oligonucleotidă care interacționează specific cu o anumită țintă biologică. Aptameri ai trombinei au fost deja identificați fiind folosiți atât pentru inhibiția proceselor biologice cât și pentru detecția acestora. În acest exemplu, un aptamer al trombinei este modificat la capătul 3' al catenei de ADN cu o secvență de 10 reziduuri de timină. La rândul ei, secvența cu reziduuri de timină prezintă grupări tiofosfat. Această secvență modificată de ADN este immobilizată pe suprafața electrodului obținut din fibre polimerice electrofilate acoperite cu strat de aur prin pulverizare în câmp magnetron și atașate termic pe substrat solid, astfel obținându-se biosenzorul cu aptamer ADN cu grupări tiofosfat. Biosenzorul este incubat în soluția de interes ce conține ținta biologică și apoi transferat în soluție de indicator electroactiv. Procesul de detecție al interacției aptamer – țintă biologică se face prin înregistrarea de spectre de impedanță electrochimică și observarea componentei reale a impedanței totale a sistemului (rezistența la transfer de sarcină) care variază în funcție de concentrația țintei biologice.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized letters, possibly 'MS', enclosed within a circular scribble.

## REVENDICĂRI

1. Procedeu pentru imobilizarea de ADN, caracterizat prin aceea că secvențele/catenele de ADN conțin grupări tiofosfat și sunt adsorbite pe suprafețe de electrod obținute din fibre polimerice electrofilate acoperite cu strat de aur prin pulverizare în câmp magnetron și atașate termic pe substrat solid.
2. Biosenzor electrochimic cu ADN, caracterizat prin aceea că imobilizarea secvențelor de ADN se face conform revendicării 1.
3. Procedeu pentru detecția mutațiilor genetice, caracterizat prin aceea că procesul de hibridizare de ADN se face utilizând biosenzorul obținut conform revendicării 2.
4. Procedeu pentru detecția de biomolecule, caracterizat prin aceea că procesul de interacție ADN-biomoleculă se face utilizând biosenzorul obținut conform revendicării 2.

A handwritten signature in black ink is written over a circular stamp. The signature consists of stylized, cursive letters. The circular stamp is faint and appears to contain some text or a logo, but it is mostly illegible.

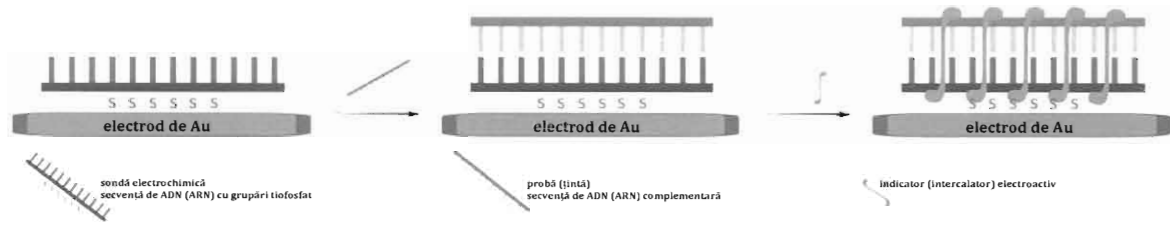


fig. 1a

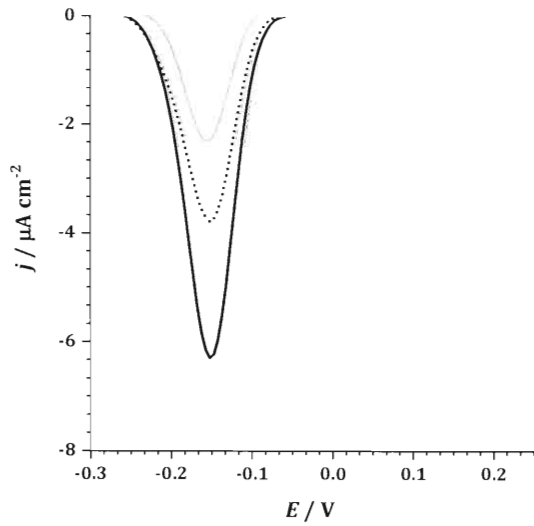


fig. 1b

Handwritten signature and a circular stamp. The stamp contains the text "ROMANIA" and "INVENTOR". The number "7" is written below the signature.

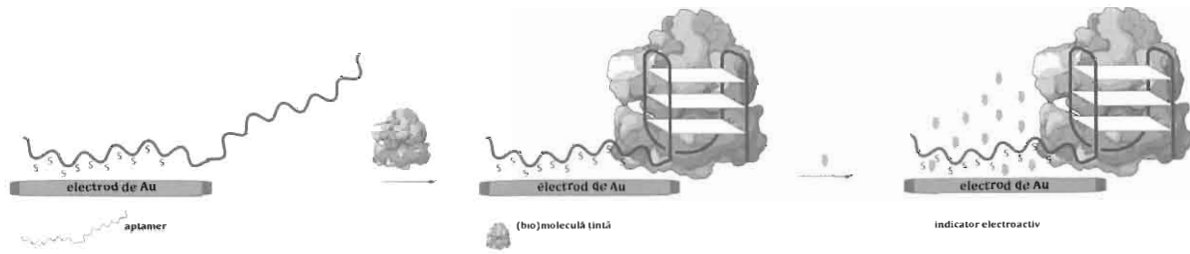


fig. 2a

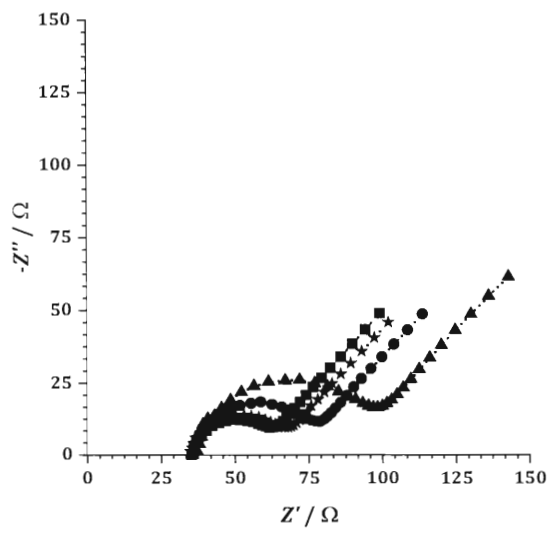


fig. 2b