



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00024**

(22) Data de depozit: **25/01/2022**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/12/2023** BOPI nr. **12/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/09/2022 BOPI nr. **9/2022**

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
MICROTEHNOLOGIE-IMT BUCUREȘTI,**
STR.EROU IANCU NICOLAE 126A,
VOLUNTARI, IF, RO

(72) Inventatori:
• **AVRAM MARIOARA, STR.FELEACU
NR. 19, BL.12 C, SC.3, AP.31, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ADIACONIȚĂ BIANCA CĂTĂLINA,**
STR.POPEȘTI-VEST, NR.31, BL.C4, ET.3,
AP.24, POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO;
• **AVRAM MARIUS ANDREI, STR.FELEACU
NR. 19, BL.12 C, SC.3, AP.31, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **PREDA PETRUȚA, BD. 1 DECEMBRIE
NR. 52, BL. A2, SC. E, AP. 13, OLTENIȚA,
CL, RO;**
• **VOIȚINCU CORNELIU,**
STR.SG. MAJ.EROU SIMION I.BUSUIOC
NR.98, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CHIRIAC EUGEN, STR. TELEGRAF SUD,
NR.58, COMUNA JIJILA, TL, RO;**
• **BURINARU TIBERIU ALECU,**
STR.TÂRGU NEAMȚ NR.12, BL.TD24, SC.1,
ET.7, AP.44, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• **MĂRCULESCU CĂTĂLIN VALENTIN,**
ȘOS. OLTENIȚEI NR. 224, BL. 6, SC. 2,
ET. 8, AP. 105, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**CN 108982622 A; RO 133995 A2;
CN 10726765 A**

(54) **SENZOR ELECTROCHIMIC ȘI PROCEDU DE REALIZARE A
SENZORULUI**



RO 136001 B1

1 Invenția se referă la un senzor electrochimic și un procedeu de realizare a senzorului
ai cărui microelectrozi de lucru interdigitați se modifică cu grafenă verticală decorată cu
3 nanoparticule de aur în vederea creșterii conductibilității electrice și implicit mărirea
sensibilității de biodetecție a celulelor tumorale circulante.

5 În procesul de metastazare celulele tumorale părăsesc tumora primară și intră în
sistemele limfatic și sanguin. Aceste celule care metastazează sunt numite celule tumorale
7 circulante (CTC). CTC-urile se deplasează în fluxul sanguin de unde pot recoloniza diferite
țesuturi în care formează tumori secundare [1]. CTC-urile provenite din cancerule epiteliale
9 sunt considerate a fi EpCAM⁺/CK⁺/DAPI⁺/CD45. Acești markeri pot fi utilizați pentru a detecta
CTC-urile și pentru a le diferenția de celelalte celule sanguine. CTC-urile pot fi folosite în
11 medicina de precizie pentru detecția precoce, alegerea strategiei de tratament și evaluarea
eficienței tratamentului. Datorită unor factori biologici sau fizici majoritatea celulelor tumorale
13 eliberate în fluxul sanguin sunt distruse, astfel încât doar un număr foarte mic de CTC-uri
(0,01%) supraviețuiesc și pot fi detectate [2]. Celulele tumorale circulante sunt o populație
15 de celule foarte slab reprezentate în fluxul sanguin, cu o concentrație de câteva celule
tumorale circulante/ml de sânge. Numărul lor este asociat cu prezența și stadiul de
17 dezvoltare al tumorii, un număr mare de CTC-uri într-o probă de sânge fiind corelat cu un
prognostic slab. Astfel, dezvoltarea unei tehnologii de depistare precoce a cancerului
19 utilizând tehnici de detecție a CTC-urilor ar putea permite diagnosticarea în stadii incipiente
și începerea imediată a tratamentului, fapt care ar reduce fără îndoială mortalitatea cauzată
21 de cancer și creșterea ratei de supraviețuire.

În mod convențional, tumorile au fost diagnosticate în primul rând pe baza biopsiei
23 țesutului tumoral și a examenului anatomopatologic. În comparație cu biopsia tisulară
tradițională, biopsia lichidă din probe de sânge este non-invazivă, prin urmare poate fi utili-
25 zată pentru a indica stadiul bolii în timp real, putând indica inclusiv informații despre evoluția
tumorii și eterogenitatea CTC-urilor și a markerilor de suprafață.

27 Tehnologiile CTC constau în principal din două etape: detecția și analizarea lor.
Prima etapă este detectarea sau capturarea. Metodele bazate pe markeri sunt în principal
29 bazate pe afinitatea de legare între proteinele de suprafață unice exprimate pe suprafața
membranei CTC-urilor, cum ar fi molecula de adeziune epitelială (EpCAM) [3].

31 Biosenzorii sunt dispozitive analitice care convertesc o reacție biologică într-un
semnal fizico-chimic măsurabil, care este direct proporțional cu concentrația analitului.
33 Structura tipică a unui biosenzor constă în două elemente: i) o suprafață de contact pe care
este legată componenta biologică care interacționează selectiv cu analitul de interes; și ii)
35 un traductor pentru detectarea evenimentului de legare a analiților la suprafața de contact.
Receptorul este cea mai importantă componentă pentru proiectarea unui biosenzor electro-
37 chimic, ceea ce implică anticorpi, peptide, acid dezoxiribonucleic (ADN), aptameri sau
polimeri imprimați molecular [4].

39 Electrozii modificați cu nanomateriale pot crește suprafața activă a electrozilor și
imobilizarea unui număr mai mare de bioreceptori, cum ar fi anticorpii și acizii nucleici.
41 Nanomaterialele 2D și nanomaterialele metalice sunt cele mai populare pentru modificarea
electrozilor. Wang et al. au raportat utilizarea grafenei și a oxidului de grafenă ca nano-
43 materiale 2D în dezvoltarea senzorilor electrochimici pentru diagnosticarea cancerului,
datorită performanțelor electrice excelente [5].

45 Din cauza lipsei celulelor tumorale care exprimă markeri specifici de suprafață
(EpCAM este utilizat în cea mai mare parte), metodele bazate pe imunoafinitate pot duce la
47 o rată ridicată de fals-negative. În prezent, doar platforma CellSearch® (Veridex, Huntingdon
Valley, PA) este aprobată de FDA pentru utilizarea clinică în stabilirea anumitor tipuri de
49 cancer. Cu toate acestea, tehnica necesită mult timp, echipamente costisitoare și funcțio-
nalizare cu anticorpi, ceea ce limitează aplicarea pe scară largă a acestei tehnologii [6].

RO 136001 B1

Până în prezent, nu am identificat brevete care să raporteze obiectivul acestei invenții și anume detecția electrochimică a celulelor tumorale circulante cu ajutorul unui senzor electrochimic pe bază de grafenă verticală. Vom aduce în discuție câteva din brevetele studiate, atât la nivel național cât și internațional, în același domeniu.

Invenția **RO 133995 (A2)** — din Martie 2020 se referă la un procedeu de selecție a celulelor tumorale circulante de adenocarcinom de colon, pentru analiza prin citometrie în flux, prin marcarea acestora cu anticorpi anti-EpCam-FITC, anti-panCK-AF647 și anti-MUC-1-AF750, pentru detecție și numărare prin citometrie în flux.

În 2016, Shen și colaboratorii au raportat un senzor electrochimic bazat pe identificarea EpCAM pentru detecția CTC-urilor prin spectroscopie de impedanță electrochimică. Pentru a atinge cea mai înaltă sensibilitate, după legarea 6-mercapto-1-hexanolului (MCH) pe electrodul de aur, proba de captură a fost poziționată în interspațiile MCH. LOD (limita de detecție) a senzorului electrochimic a fost de 10 celule mL^{-1} cu un interval liniar de la 30 până la 10^6 celule mL^{-1} [7].

Brevetul **KR 101188172 B1** din Octombrie 2012 se referă la un biosenzor electrochimic și la o metodă de fabricare a acestuia, electrodul de lucru fiind îmbunătățit cu un strat de diamant dopat cu impurități, grafenă monostrat format pe stratul de diamant dopat cu impurități și un strat de nanoparticule metalice format pe stratul de grafenă.

Brevetul **US 10935550 B2** din Martie 2021 se referă la un sistem bazat pe oxid de grafenă pentru detectarea celulelor rare, cum ar fi CTC-urile. Sistemul include oxidul de grafenă dispus pe substrat de aur, linkerul GMBS legat de oxidul de grafenă, NeutrAvidin legat de linkerul GMBS, anticorpul EpCAM biotinitat la NeutrAvidin și celula tumorală legată de anticorpul EpCAM biotinitat.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în detecția electrochimică a celulelor tumorale circulante.

Senzorul electrochimic cu microelectrozi interdigitați pentru detecția celulelor tumorale circulante, conform invenției, este constituit din patru microelectrozi, dintre care, doi microelectrozi interdigitați de lucru din Au modificați cu grafenă verticală pentru creșterea conductibilității electrice, un microelectrod de referință din CrAg/AgCl și un microelectrod auxiliar din Au.

Procedeu de realizare a senzorului electrochimic, conform invenției, constă în următoarea succesiune de etape:

- se crește pe o plachetă de siliciu a unui oxid termic de aproximativ 300nm la 1000°C , apoi filmul de SiO_2 se deshidratează în hexametildisilazan la 150°C timp de 30 minute;

- se depune pe microelectrozi de lucru TiN de 50nm prin pulverizare catodică RF în vederea realizării unei bariere de difuzie a aurului în substrat;

- se depune Cr/Au pe toți cei patru microelectrozi;

- se crește grafena verticală pe cei doi microelectrozi de lucru;

- se metalizează cu Ag, cca 100nm, microelectrodul de referință;

- se pasivează traseele metalice cu un strat de 15nm Al_2O_3 depus ALD;

- se clorurează AgCl electrochimic electrodul de referință.

Senzorul construit, conform invenției, este mult mai sensibil prin comparație cu senzorii electrochimici ai căror microelectrozi interdigitați sunt metalici. Creșterea sensibilității se datorează creșterii conductibilității electrice care este direct proporțională cu mobilitatea și concentrația electronilor, și se obține prin modificarea controlată a microelectrozilor din aur cu grafenă verticală decorată cu nanoparticule de aur. Grafenă verticală este formată din foi

RO 136001 B1

1 grafenice de grosime atomică orientate perpendicular pe suprafața electrozilor. Grafenă este
cunoscută ca fiind materialul cu mobilitatea electronilor foarte mare. Grafenă se decorează
3 cu nanoparticule de aur pentru a crește suprafața de biodetecție și concentrația superficială
a electronilor.

5 Se dă în continuare un exemplu de realizare al invenției în legătură cu fig. 1...6 care
reprezintă:

7 - fig. 1, fluxul tehnologic pentru senzorul electrochimic;

- fig. 2, modelarea fluxului tehnologic în vederea fabricării senzorului electrochimic;

9 - fig. 3, vedere a senzorului electrochimic cu electrozi interdigitați modificați cu
grafenă verticală;

11 - fig. 4, diagrama Nyquist (stânga) și diagrama Bode (dreapta): reprezintă variația
impedanței imaginare în funcție de rezistența electrică și respectiv a diferenței de fază dintre
13 curent și tensiune în funcție de frecvență pentru trei concentrații diferite de celule HT 29;

15 - fig. 5, diagrama Nyquist (stânga) și diagrama Bode (dreapta): reprezintă variația
impedanței imaginare în funcție de rezistența electrică și respectiv a diferenței de fază dintre
curent și tensiune în funcție de frecvență pentru trei concentrații diferite de celule SW 403;

17 - fig. 6, diagrama Nyquist (stânga) și diagrama Bode (dreapta): reprezintă curbele de
variație la atașarea celulelor adenocarcinom de colon SW403 și a celulelor HT29 în con-
19 concentrație 100 celule/ml, sau 10 celule în 100 μ l injectați în camera de reacție.

Microfabricația senzorului electrochimic cu electrozi interdigitați modificați cu grafenă
21 verticală, conform invenției, este schematizată în fig. 1. Pașii de modelare a fluxului
tehnologic în vederea fabricării senzorului electrochimic sunt detaliați în fig. 2. Procesul de
23 bază al microfabricației microelectrozilor interdigitați pe bază de grafenă verticală este
fotolitografia: transferul optic al geometriei de pe cele 3 măști, pe un substrat acoperit cu un
25 strat de fotorezist. Pașii urmați în etapa de fabricație a dispozitivului și de configurare a
electrozilor sunt:

27 1) Pregătirea substratului: curățarea plachetei de Si prin imersare în soluție Piranha,
urmată de spălarea cu apă deionizată și uscare prin centrifugare în atmosferă de azot;

29 2) Bioxidul de siliciu crescut termic în atmosferă umedă cu o grosime de aproximativ
300 nm: oxidare termică la temperatura de 1000°C, curățare în Piranha și ADI, deshidratare
31 film oxidic la 150°C, timp de 30 minute, în hexametildisilazan;

33 3) Acoperire cu fotorezist și paternare folosind masca M1 - configurația straturilor
metalice: procesul de fotogravură M1 pentru configurarea microelectrozilor: 2 electrozi de
lucru interdigitați, electrod de numărare, electrod de referință, trasee și pinout-uri, presupune
35 etalarea fotorezistului LOR 5A și fotorezistului AZ 1518, aliniere Masca M1, expunere la UV
și dezvoltare;

37 4) Depunere TiN de 50 nm prin pulverizare catodică RF în vederea
realizării unei bariere de difuzie a aurului în substrat, la o temperatură de 50°C, în atmosferă
39 de Ar: 25 sccm și N2: 10 sccm, timp: 50 min.

5) Metalizare prin depunerea unui film subțire de Cr (10 nm) și a unui film de Au
41 (200 nm);

6) Procesul de Lift-off și curățare plachetă;

43 7) Creșterea grafenei verticale prin PECVD: temperatura 700°C; timp de creștere 1h;
presiune 300 mTorr; fluxul de gaze Ar-190 sccm, CH4 -10 sccm;

45 8) Acoperire cu fotorezist și modelare folosind masca M2 - configurația electrozilor
interdigitați cu grafenă verticală: etalare fotorezist AZ4562 prin centrifugare la 3000 rpm;
47 tratament termic pe plită la temperatura de 90°C, timp de 30 min; aliniere mască M2 cu
substratul; expunere la radiații UV405, timp de 40 sec; dezvoltare;

RO 136001 B1

9) Corodare grafenă verticală în RIE: în urma acestui proces grafena verticală va fi prezentă doar pe electrozii de lucru. Coorodarea RIE are loc în plasmă O ₂ , 250 W, 20 Pa, 5 min;	1 3
10) Îndepărtare fotorezist și curățare plachetă: Acetonă, alcool izopropilic;	
11) Acoperire cu fotorezist și modelare cu ajutorul măștii M3 - pasivarea straturilor metalice: etalare fotorezist LOR 10B prin centrifugare la 3000 rpm, tratament termic la temperatura de 160°C, timp de 5 min, etalare AZ 1518 prin centrifugare la 3000 rpm, tratament termic la temperatura de 100°C, timp de 1 min, expunere Masca M3: 7, 8 sec, dezvoltare: 30 sec; Metalizare pentru masca M3: depunere Ag: viteza de depunere: Au: 5Å/sec, grosime film de Ag 200 nm;	5 7 9
12) Depunere Al ₂ O ₃ prin ALD (Atomic Layer Deposition) cu o grosime a stratului de 15 nm;	11
13) Lift-off metal prin imersie în acetonă încălzită la 50°C, timp de 18 ore; ultrasonare în acetona încălzită la 50°C; spălare în ADI.	13
După microfabricația senzorilor electrochimici, conform invenției, urmează trasarea senzorilor individuali (fig. 3).	15
Decorarea cu nanoparticule de aur (AuNPs) a electrozilor de lucru pe bază de grafenă verticală, conform invenției, se realizează prin imobilizarea covalentă a AuNPs pe suprafața grafenei după silanizarea suprafeței în soluție apoasă de (3-Aminopropil) trietoxisilan (APTES) (10%). Procesul de silanizare realizându-se astfel: suprafața de lucru a senzorilor electrochimici (interdigii de aur cu GV) a fost tratată cu 20 μl soluție APTES, timp de 30 min. Ulterior, senzorii au fost riguros spălați cu apă deionizată. Apoi, după uscarea la temperatura camerei senzorii au fost menținuți în etuvă, timp de 10 minute, la 120°C, pentru a preveni eluarea APTES rămas după spălare.	17 19 21 23
După tratarea cu APTES, senzorii au fost imersați 24 h în soluție coloidală de AuNPs, apoi au fost spălați și uscați la temperatura camerei. Atașarea AuNPs s-a realizat prin interacțiuni electrostatice, realizate între sarcina electrică negativă a AuNPs și sarcina electrică pozitivă a grupării amino din structura APTES.	25 27
Procesul de conjugare a AuNPs constă în imersarea senzorului în soluție de clorhidrat de cisteamină (10mM) (Sigma-Algrich, USA), pentru 2 h, la temperatura camerei, apoi, acesta a fost spălat cu apă deionizată (x3), după care cisteamină legată de AuNPs a fost activată prin incubarea timp 1 h a senzorului în soluție 2,5% glutaraldehidă (Sigma-Algrich, USA). Activarea a fost necesară pentru atașarea specifică a anticorpului. După tratarea cu glutaraldehidă s-a spălat senzorul, iar apoi 10 ul soluție de anticorpi anti-EpCAM (clonă de șoarece, Nordic BioSite) de concentrație 1:100 a fost etalată pe suprafața electrozilor cu GV, suprafața fiind complet acoperită de soluția de anticorpi. Senzorul a fost incubat în atmosferă umedă timp de 1 h, la temperatura camerei. La finalul perioadei de incubare senzorul a fost spălat cu tampon fosfat salin (PBS), pH 7.4. După etapa de spălare senzorul a fost etalat în zona GV cu 10 μl soluție 1% de albumină serică bovină (Sigma-Aldrich, New Zealand), pentru blocarea grupărilor aldehidă nereacționate, și pentru a minimiza adsorbția nespecifică a anticorpului secundar marcat fluorescent, cu care s-a dorit punerea în evidență a funcționării procesului de imobilizare a anticorpilor EpCAM pe suprafața AuNPs. După spălarea cu PBS a dispozitivului s-au etalat 10 μl de anticorp secundar (100 μg/ml) anti-șoarece IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Flour 488 (Invitrogen, ThermoFisher). Condițiile de incubare sunt similare ca în cazul anti-EpCAM, descrise anterior.	29 31 33 35 37 39 41 43 45

RO 136001 B1

1 Pentru detecția CTC-urilor au fost folosite două linii celulare cu diverse concentrații:
2 Linia celulară umană de adenocarcinom de colon SW-403 (Nr. Cat. 87071008) și linia HT-29
3 (Nr. Cat. 91072201), achiziționate din Colecția Europeană de Culturi Celulare Autentificate
4 (ECACC). Linia SW-403 a fost cultivată în mediu de cultură RPMI-1640 (Bio Whittaker
5 Lonza), iar linia HT-29 în Mc-Coy's 5A (Bio Whittaker Lonza), suplimentate cu 10% ser fetal
6 bovin (FBS, Euroclone, America de Sud) și 100 µg/ml penicilină + 100 µg/ml streptomicină
7 (Lonza) (mediu de cultură complet).

8 Celulele au fost incubate la 37°C într-o atmosferă suplimentată cu 5% CO₂, în
9 recipiente de 75 cm². Linia celulară aderente HT-29 a fost cultivată până la confluență de
10 85%, apoi spălate cu soluție tampon fosfat salin (PBS, Sigma) și detașate folosind soluție
11 0,05% de tripsină-EDTA. Celulele au fost apoi suspendate în mediu de cultură complet,
12 separate prin centrifugare la 200 rotații pe minut timp de 10 minute și resuspendate în mediu
13 de cultură complet proaspăt. Celulele au fost spălate o dată cu soluție tampon fosfat salin
14 (PBS) și de două ori cu soluție de zaharoză 250 mM înainte de a fi resuspendate în aceeași
15 soluție de zaharoză pentru teste.

16 Mediul de suspensie cu conductivitate scăzută (250 mM zaharoză, 13 mS/m
17 conductivitate) a fost ales pe baza datelor de viabilitate din experimentele preliminare și
18 preparat prin dizolvarea zaharozei (Sigma) în apă distilată și ajustarea pH-ului la 7,4.

19 Senzorii funcționalizați au fost incubați timp de 1 h cu linia celulară, la diferite concen-
20 trații, după care au urmat măsurători electrochimice de impedanță prin evidențierea diagra-
21 mei Nyquist și Bode, realizate prin metoda de Spectroscopie de Impedanță Electrochimică
22 cu ajutorul potențiostatului PGSTAT204 cu modul FRA32M: modulul de spectroscopie de
23 impedanță electrochimică (EIS).

24 În diagrama Nyquist (fig. 4) este reprezentată impedanță imaginară (-Z'') în funcție
25 de impedanță reală (Z'). Variația liniară a impedanței imaginare în funcție de impedanță reală
26 corespunzătoare frecvențelor mici se datorează difuziei Warburg. Se observă creșterea
27 rezistenței la transfer de sarcină cu mărirea concentrației celulelor.

28 Curbele de variație din fig. 5, pentru SW403, arată diferit de cele din fig. 4, pentru HT
29 29, deoarece celulele SW403 se aglomerează formând conglomerate mari.

30 Se observă din fig.6, atât din diagrama Nyquist, cât și din variația diferenței de fază
31 dintre curent și tensiune, că celulele HT 29 față de SW403 au: rezistența la transferul sarcinii
32 electrice mai mică, permitivitatea și conductivitatea electrică mai mari.

33 Celulele tumorale din linia HT29 au o suprafață membranară foarte pliată datorită
34 microvililor și deci au o suprafață celulară mult mai mare comparativ cu celulele din linia
35 SW403. În concluzie HT29 au capacitatea membranară mai mare, iar reactanța capacitivă
36 mai mică. Capacitatea membranară mai mare a celulelor HT29 determină stocarea unui
37 număr mai mare de sarcini electrice, ceea ce conduce la o conductivitate mai mare și o
38 rezistență a transferului de sarcină mai mică. La nivelul microvililor există o concentrație
39 foarte mare de punți lipidice în special de colesterol-glicosfingolipide. Dacă suprafața
40 celulelor HT29 este mult mai mare comparativ cu SW403, înseamnă că și concentrația de
41 punți lipidice adică de colesterol-glicosfingolipide este mult mai mare. Celulele tumorale din
42 linia SW403 aderă și formează conglomerate celulare mari.

Bibliografie

- 43
- 44 [1]. Hu X, Zang X and Lv Y: Detection of circulating tumor cells: Advances and critical
45 concerns (Review). *Oncol Lett* 21: 422, 2021.
- 46 [2]. Tayoun T, Faugeroux V, Oulhen M, Aberlenc A, Pawlikowska P and Farace F:
47 CTC-derived models: A window into the seeding capacity of circulating tumor cells (CTCs).
48 *Cells* 8: 1145, 2019.
- 49

RO 136001 B1

- [3]. Thiele JA, Bethel K, Králícková M and Kuhn P: Circulating tumor cells: Fluid surrogates of solid tumors. *Annu Rev Pathol* 12: 419-447, 2017. 1
- [4]. Feiyun Cui, Zhiru Zhou, and H. Susan Zhou, Review-Measurement and Analysis of Cancer Biomarkers Based on Electrochemical Biosensors, *Journal of The Electrochemical Society*, 2020 167 037525. 3
5
- [5]. L. Wang, Q. Xiong, F. Xiao, and H. Duan, 2D nanomaterials based electrochemical biosensors for cancer diagnosis. *Biosens. Bioelectron.*, 89, 136 (2017). 7
- [6]. Kalinich, M., Bhan, I., Kwan, T.T., Miyamoto, D.T., Javaid, S., LiCausi, J.A., Milner, J.D., Hong, X., Goyal, L., Sil, S., An RNA-based signature enables high specificity detection of circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma, 2017. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114 (5), 1123-1128. 9
11
- [7]. H. Shen, J. Yang, Z. Chen, X. Chen, L. Wang, J. Hu, F. Ji, G. Xie, W. Feng, A novel label-free and reusable electrochemical cytosensor for highly sensitive detection and specific collection of CTCs, *Biosens. Bioelectron.*, 81 (2016), pp. 495-502. 13
- RO133995 (A2)- <https://patents.google.com/patent/RO133995A2> 15
- KR101188172B1 - <https://patents.google.com/patent/KR101188172B1>
- US10935550B2- <https://patents.google.com/patent/US10935550B2> 17

RO 136001 B1

Revendicări

1
3 1. Senzor electrochimic cu microelectrozi interdigitați pentru detecția celulelor
5 tumorale circulante, **caracterizat prin aceea că** este constituit din patru microelectrozi, dintre
7 care doi microelectrozi interdigitați de lucru din Au modificați cu grafenă verticală pentru
creșterea conductibilității electrice, un microelectrod de referință din CrAg/AgCl și un micro-
electrod auxiliar din Au.

9 2. Procedeu de realizare a senzorului electrochimic de la revendicarea 1 **caracterizat
prin aceea că** constă în următoarea succesiune de etape:

11 - se crește pe o plachetă de siliciu a unui oxid termic de aproximativ 300 nm la
1000°C, apoi filmul de SiO₂ se deshidratează în hexametildisilazan la 150°C timp de
30 minute;

13 - se depune pe microelectrozi de lucru TiN de 50nm prin pulverizare catodică RF în
vederea realizării unei bariere de difuzie a aurului în substrat;

15 - se depune Cr/Au pe toți cei patru microelectrozi;

- se crește grafena verticală pe cei doi microelectrozi de lucru;

17 - se metalizează cu Ag, cca 100 nm, microelectrodul de referință;

- se pasivează traseele metalice cu un strat de 15nm Al₂O₃ depus ALD;

19 - se clorurează AgCl electrochimic electrodul de referință.

21 3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** se modifică
microelectrozii interdigitați de lucru cu grafenă verticală, pentru îmbunătățire a detecției,
crescută direct pe microelectrozii interdigitați metalici din Au folosind nitrură de titan TiN ca
23 barieră de difuzie, prin metoda de depunere chimică din fază de vapori asistată de plasmă,
PECVD, la temperatura 700°C, timp 1h, presiune 300 mTorr, fluxul de gaze Ar - 190 sccm,
25 CH4 -10 sccm.

27 4. Procedeu conform revendicărilor 2 și 3, **caracterizat prin aceea că** se decorează
grafena verticală cu nanoparticule de aur în vederea facilitării funcționalizării și creșterii
semnalului de biodetecție, prin:

29 - silanizarea suprafeței în 20 μl soluție APTES (10%);

31 - imersie în soluție coloidală de nanoparticule de aur timp de 24 ore la temperatura
camerei.

33 5. Procedeu conform revendicărilor 2-4, **caracterizat prin aceea că** se funcționali-
zează grafena verticală decorată cu nanoparticule de aur specific cu anticorpi anti-EpCAM
astfel:

35 - imersie în soluție de clorhidrat de cisteamină 10 mM, pentru 2 h, la temperatura
camerei;

37 - activare prin incubarea timp 1 h în soluție 2,5% glutaraldehidă;

39 - etalare 10 μl soluție de anticorpi anti-EpCAM, clonă de șoarece, de concentrație
1:100 și incubare în atmosferă umedă timp de 1 h, la temperatura camerei;

41 - etalare 10 μl soluție 1% de albumină serică bovină pentru blocarea grupărilor
aldehidă nereacționate, și pentru a minimiza adsorbția nespecifică a anticorpului secundar
marcat fluorescent;

43 - etalare 10 μl anticorp secundar 100 μg/ml anti-șoarece IgG (H+L) și incubare în
atmosferă umedă timp de 1 h, la temperatura camerei.

(51) Int.Cl.

G01N 27/327^(2006.01),

G01N 33/50^(2006.01)

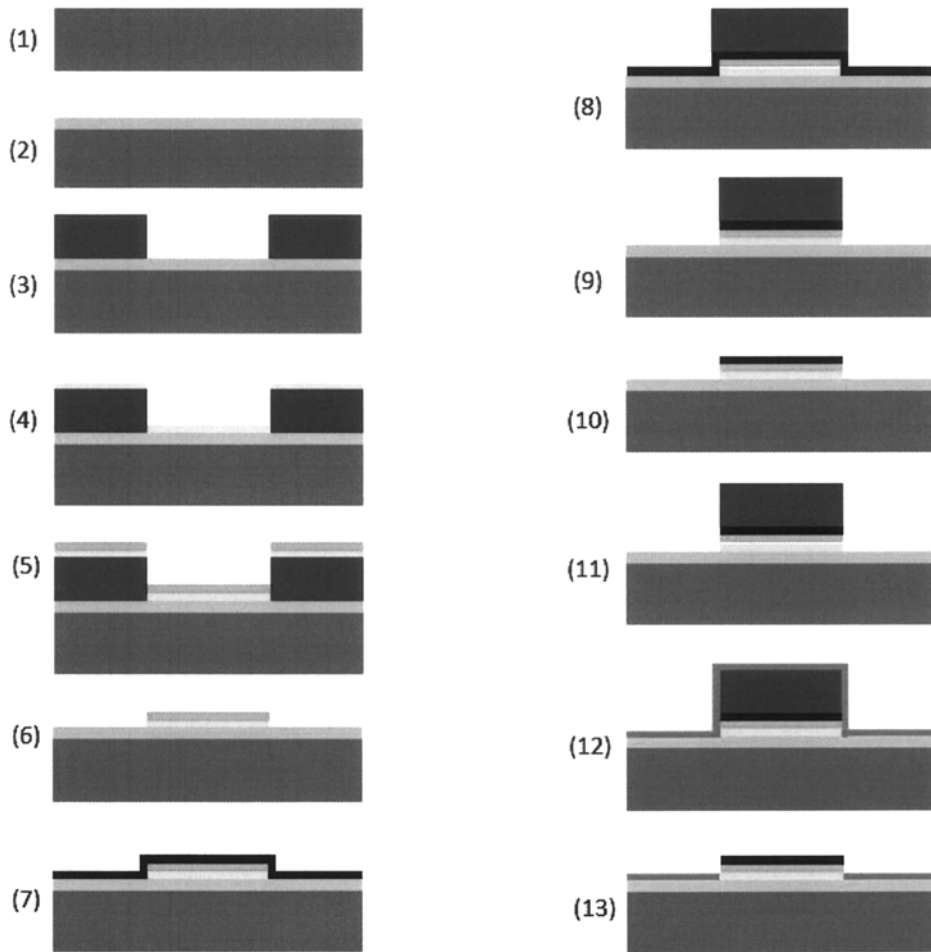


Fig. 1

(51) Int.Cl.

G01N 27/327 (2006.01),

G01N 33/50 (2006.01)

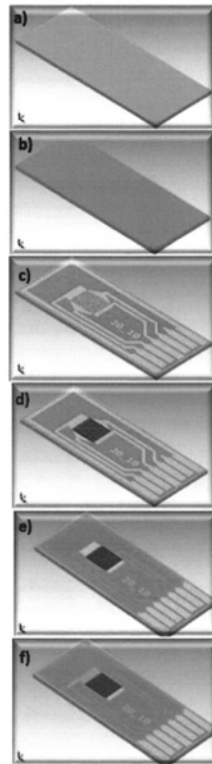


Fig. 2

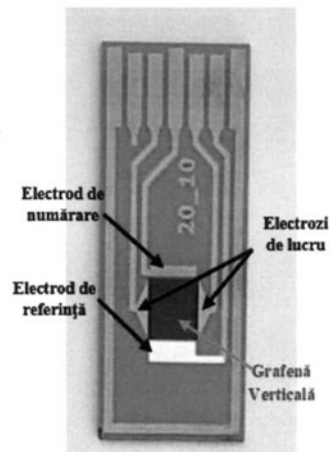


Fig. 3

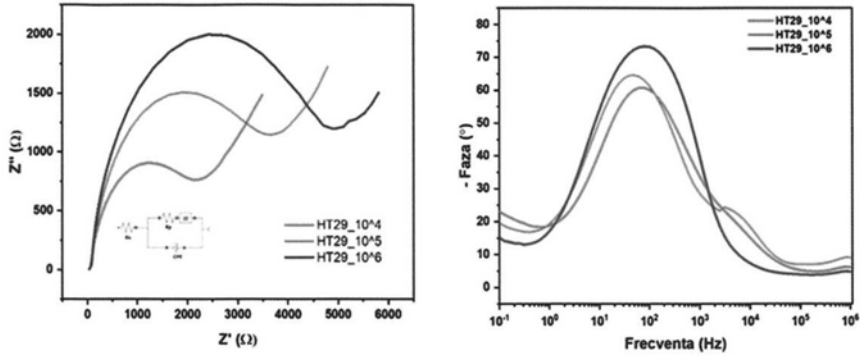


Fig. 4

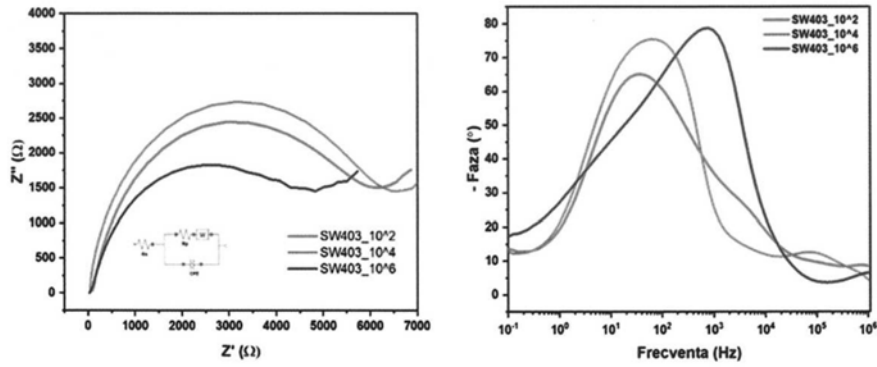


Fig. 5

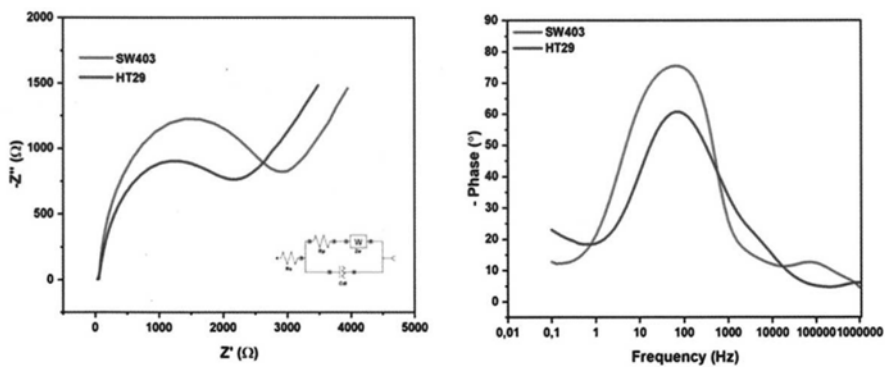


Fig. 6

