



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00326**

(22) Data de depozit: **11/06/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2022 BOPI nr. **12/2022**

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
- DEZVOLTARE PENTRU FIZICĂ ȘI
INGINERIE NUCLEARĂ "HORIA
HULUBEI" (IFIN-HH), STR.REACTORULUI,
NR.30, MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:
• AUDE SADET, STR.VEDEA NR.6,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• TELEANU FLORIN, STR.FIZICIENILOR
NR.40 A, MĂGURELE, IF, RO;
• VASOS PAUL ROMEO,
STR.GRIGORE ALEXANDRESCU NR.5,
PLOIEȘTI, PH, RO

(54) **METODĂ DE MĂSURARE A DISTANȚELOR
INTRAMOLECULARE SAU INTERMOLECULARE FOLOSIND
REZONANȚA MAGNETICĂ ÎN STARE LICHIDĂ PRIN TEHNICI
BAZATE PE COERENȚE CU VIAȚĂ LUNGĂ ALE SPINILOR
NUCLEARI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de rezonanță magnetică nucleară pentru determinarea distanțelor intramoleculare sau intermoleculare folosind stări coerente de spini cu durată mare de viață (LLC-Long-lived coherences) care permite descrierea mai exactă a zonelor active din structura proteinelor/ enzimelor, având aplicații în domeniul dezvoltării de noi medicamente. Metoda conform invenției cuprinde o etapă de creare și susținere, cu ajutorul pulsurilor de radiofrecvență, a stării LLC, evoluția acesteia ducând la

transferul de magnetizare către nucleele vecine, magnetizare observabilă prin întreruperea câmpului de radiofrecvență și detectarea semnalului, amplitudinea transferului de la LLC la nucleele vecine fiind invers proporțională cu distanța între nucleele sursă și nucleele excitate, astfel încât se pot obține date despre geometria moleculară în care se găsesc atomii.

Revendicări: 5
Figuri: 3



~~SECRET DE SERVICIU~~ OSIM

8/9/11.06.2021

Metoda de masurare a distantelor intramoleculare sau intermoleculare folosind rezonanta magnetica in stare lichida prin tehnici bazate pe coerente cu viata lunga a spinilor nuclear

DESCRIERE

Inventia se refera la o metoda de rezonanta magnetica nucleara pentru determinarea distantelor intramoleculare sau intermoleculare folosind stari coerente de spini cu durata mare de viata (Long-lived coherences – LLCs). Aceasta metoda noua poate imbunatati rezolutia spatiala a structurilor moleculare determinate experimental in stare lichida si permite descrierea mai exacta a zonelor active din structura proteinelor/enzimelor. Informatia cu privire la aceste zone ajuta la dezvoltarea de noi medicamente cu afinitate specifica fiecarui site active al proteinelor vizate.

Rezonanta magnetica nucleara (RMN) poate oferi informatii privind compozitia amestecurilor, natura chimica a substantelor, transformarile suferite de acestea, cat si dispunerea spatiala a atomilor in molecule. Metodele consacrate inca din anii 80' de determinare structurala, precum NOESY si ROESY (Kumar, A., Ernst, R. R. & Wutrich, K. A two dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **95**, 1-6 1980; Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J., Warren, C. D. & Jeanloz, R. W. Structure determination of tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame. *Journal of American Chemical Society* **106**, 811-813 1984), se bazeaza pe masurarea amplitudinii transferului de magnetizare de la un nucleu "sursa" la nucleele vecine. Acest transfer este invers proportional cu distanta dintre atomii ce comunica prin cuplaj dipolar in spatiu. Astfel se pot stabili valori estimative ale distantelor interatomice pana la maximum 5-6 Angstromi. Limitarea aceasta apare, imparte, datorita timpului de viata scurt al ordinii spinilor nucleari.

Pentru detectia pe distante mai mari, de ordinul nanometrilor, se cunosc tehnici precum transferul rezonant de fluorescanta (fluorescence resonance energy transfer – FRET) care se bazeaza pe introducerea unei grupari fluorofore la nivelul proteinei si schimbarea lungimii de unda emise ca urmare a interactiunii cu alte grupari vecine (Day, Richard (eds.). *Molecular Imaging: FRET Microscopy and Spectroscopy*. Oxford: Oxford University Press). Desi metoda permite masurarea distantelor pana la 10 nm, prezinta dezavantaje evidente precum alterarea site-ului activ studiat prin inserarea unui fluorofor, posibila modificare a semnalului ca urmare a unor reactii fotochimice sau durate de pana la cateva ore pentru ansamblarea complexului proteina-fluorofor. De asemenea, metoda nu poate oferi rezolutie atomica si este mai degraba utilizata pentru observarea modificarilor conformationale decat pentru obtinerea distantelor absolute. Obiectivul prezentei inventii este acela de a elimina sau cel putin a reduce dezavantajele solutiilor cunoscute din stadiul tehnicii.

~~SECRET DE SERVICIU~~

Ande Sadet R Paul Vasos

~~SECRET DE SERVICIU~~

Solutia la aceasta problema o constituie o metoda de masurare a distantelor intramoleculare sau intermoleculare folosind rezonanta magnetica in stare lichida prin tehnici bazate pe coerente de spin cu viata lunga, in care baza de reprezentare mecanico-cuantica a evolutiei unei perechi de spini $1/2$ echivalenti este baza-singlet-triplet: $\Phi_{ST} = \{T_{+1} = |\alpha\alpha\rangle; T_0 = N(|\alpha\beta\rangle + |\beta\alpha\rangle); S_0 = N(|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle); T_{-1} = |\beta\beta\rangle\}$ unde $N = 2^{-1/2}$, in care starea coerent cu durata mare de viata (LLC) este data de superpozitia dintre starile singlet S_0 si triplet T_0 cu expresia:

$$LLC = |S_0\rangle\langle T_0| + |T_0\rangle\langle S_0| \quad (\text{Ecuatia 1})$$

Daca se utilizeaza conversia din baza singlet-triplet in baza componentelor carteziene ale magnetizarii, expresia starii este data de $LLC = I_z - S_z$, unde I_z si S_z sunt proiectiile momentului angular total de spin pentru spinii I, respectiv S, pe axa z.

Ordinea de spin este creata si detectata prin:

- identificarea dintr-un spectru monodimensional a deplasarilor chimice ale celor doi protoni si a cuplajului dintre acestia.
- polarizarea spinilor in camp magnetic este data de distributia Boltzmann si cuprinde suma magnetizarilor longitudinale a fiecarui proton din amestec.
- transmiterea unui prim set de trei pulsuri care izoleaza componentele longitudinale ale protonilor de interes (care vor forma LLC) din care se obtine starea $I_z + S_z$;
- transformarea acestei stari intr-o diferenta de magnetizare longitudinala $I_z - S_z$ cu ajutorul unui puls selectiv;
- transmiterea unui puls neselectiv care roteste magnetizarea totala in plan transversal;
- sustinerea starii LLC prin aplicarea continua a unui puls de radio-frecventa (rf) pentru a-i face magnetic echivalenti pentru un timp $\tau_{transfer}$;
- intretinerea coerentei pe durata de timp $\tau_{transfer}$ in care ordinea de spin se degradeaza exponential si oscilatoriu cu transfer de magnetizare catre nucleele vecine;
- transformarea starii LLC intr-o forma de magnetizare observabila prin intreruperea campului radio-frecventa si detectarea semnalului, in care amplitudinea transferului de la LLC la nucleele vecine este invers proportionala cu distanta intre nucleele sursa si nucleele excitate, astfel ca se pot obtine date despre geometria moleculara in care se gasesc atomii;

Intr-un exemplu preferat de realizare a inventiei, metoda asigura masurarea distantelor interatomice pe un domeniu spatial mai extins pentru ROE folosind LLC, in cazul proteinelor de mari dimensiuni sau plasate in medii vascoase.

Intr-un alt exemplu preferat de realizare a inventiei, metoda este folosita atat pentru masurarea distantelor intramoleculare, cat si pentru masurarea distantelor intermoleculare, permitand descrierea structurilor complexelor biomoleculare sau proteina-ligand.

De preferinta, metoda permite masurarea transferului $LLC \rightarrow LLC$ in cadrul proteinelor probata computationally, dovandindu-se superioara metodelor clasice de transfer de magnetizare.

~~SECRET DE SERVICIU~~

2

André Gadet R Paul Vasos

SECRET

~~SECRET DE SERVICIU~~

In mod avantajos, etapa mentionata de detectare a semnalului permite, de asemenea, urmarirea semnalelor corespunzatoare altor atomi din molecule ce indica prezenta transferului de magnetizare de la LLC.

Alte obiective, caracteristici si avantaje ale prezentei inventii vor reiesi mai clar din urmatoarea descriere detaliata a unui exemplu de realizare a inventiei, data intr-o maniera ilustrativa si nu limitativa, cu referire la Figurile anexate, in care:

Fig 1. prezinta A) Structura AlaGly si spinii relevanti crearii starii LLC (verde) si vecinii cuplati prin contact dipolar (albastru). B) Spectrul 1D al AlaGly cu zoom-in pe domeniul protonilor glicinei folositi pentru generarea LLC. C) Secventa de puls pentru realizarea experimentului ROE LLC cu peptida AlaGly: primul si al treilea puls sunt pulsuri tari de 90 de grade cu faza ϕ_1 si ϕ_2 . Un puls selectiv de 180 de grade P_{11} este aplicat ambilor protoni ai glicinei. Urmatorul puls selectiv inverseaza orientarea doar a unuia din protonii glicinei, generand starea $I_z - S_z$ sau $-I_z + S_z$ in functie de frecventa la care este aplicat. Ultimul pas rotește cu 90 de grade magnetizarea si creaza starea $I_x - S_x$ sau $-I_x + S_x$. Aceasta este sustinuta de iradiere continua cu un puls slab de faza x pentru un timp $\tau_{transfer}$. Gradientii de puls folositi au valorile $G1=37\%$ si $G2=28\%$ din amplitudinea maxima. Ciclul fazelor este $\phi_1=(x,-x)$, $\phi_2=(y,y,-y,-y)$, $\phi_3=(y)$, $\phi_{rec}=(x,-x,x,-x)$.

Fig 2. prezinta A) Curba experimentală de transfer ROE între protonii Ala-CH₃ și suma magnetizării transversale a protonilor glicinei (stanga). Dovada experimentală a transferului între protonii Ala-CH₃ către starea LLC formată cu protonii glicinei (dreapta). Punctele au fost normalizate față de amplitudinea stării de detectie în fiecare caz. B) Simulare a variației intensității magnetizării transferate de la o pereche de protoni (cercuri verzi) la un al treilea proton aflat la distanța de 7, respectiv 8 Angstromi., când protonii centrali formează LLC (punctele roșii) sau au același semn al proiecției momentului angular de spin, fiind descriși de starea $I_x + S_x$ (punctele albastre). Al treilea proton este deplasat pe două arce de cerc similare, aria fiecărui punct fiind direct proporțională cu amplitudinea transferului de magnetizare. Se observă că transferul LLC → K este mai intens la aceste distanțe decât transferul clasic. Timpul de corelație pentru mișcarea de difuzie rotațională a fost considerat 80ns. C) Simulare a transferului de magnetizare de la starea LLC formată din doi protoni la un al treilea proton (roșu) comparativ cu transferul de la starea $I_x + S_x$ la același proton. Se observă că transferul cu LLC are amplitudine mai mare decât cel în cazul clasic. Timpul de corelație pentru mișcarea de difuzie rotațională a fost considerat 50ns.

Fig 3. prezinta curba calculata pentru transferul magnetizării de la starea LLC creata cu protonii reziduului Gly76 (I și S) la starea LLC creata cu protonii reziduului Gly75 (K și L) din Ubiquitina. Coordonatele au fost extrase din fisierul PDB 1D3Z, iar simularea a fost realizata cu pachetul de programe Spinach in Matlab. Timpul de corelație pentru mișcarea de difuzie rotațională a fost considerat 10 ns.

~~SECRET DE SERVICIU~~

3

André Gadet K Paul Vasile

NESECRET

~~SECRET DE SERVICIU~~**DESCRIEREA DETALIAZA A UNUI EXEMPLU DE REALIZARE**

S-a dovedit recent (Sarkar, R., Ahuja, P., Vasos, P. R., Bodenhausen, G. Long-lived coherences for homogeneous line narrowing in spectroscopy, *Physical Review Letters*, **104**, 05300, 2010) ca este posibil sa fie create si sustinute coerente intre momentele magnetice a doi atomi de hidrogen cu spinul $\frac{1}{2}$ (notati I si S) izolati la distante suficient de mari de alti protoni din molecula.

In cazul unei singure perechi de spini $\frac{1}{2}$ echivalenti, baza de reprezentare mecanico-cuantica adecvata a evolutiei acestora este baza singlet-triplet $\Phi_{ST} = \{T_{+1} = |\alpha\alpha\rangle; T_0 = N(|\alpha\beta\rangle + |\beta\alpha\rangle); S_0 = N(|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle); T_{-1} = |\beta\beta\rangle\}$ unde $N = 2^{-1/2}$, in care starea coerenta cu durata mare de viata (LLC) este data de superpozitia dintre starile singlet S_0 si triplet T_0 cu expresia:

$$LLC = |S_0\rangle\langle T_0| + |T_0\rangle\langle S_0| \quad (\text{Ecuatia 1})$$

In practica, se utilizeaza conversia din baza singlet-triplet in baza componentelor carteziane ale magnetizarii, si anume, $LLC = I_z - S_z$, unde I_z si S_z sunt proiectiile momentului angular total de spin pentru spinii I, respectiv S, pe axa z.

Aceasta ordine de spin poate fi creata si detectata in modul descris in Figura 1:

1. se identifica dintr-un spectru monodimensional deplasările chimice ale celor doi protoni si cuplajul scalar dintre acestia
2. polarizarea spinilor in camp magnetic este data de distributia Boltzmann si cuprinde suma magnetizarilor longitudinale a fiecarui proton din amestec
3. primul set de trei pulsuri izoleaza componentele longitudinale ale protonilor de interes (care vor constitui LLC) prin metoda cunoscuta drept "spin echo" din care se obtine starea $I_z + S_z$;
4. aceasta stare este transformata intr-o diferenta de magnetizare longitudinala $I_z - S_z$ cu ajutorul unui puls selectiv (in acest caz aplicat la frecventa Larmor a spinului S);
5. un puls neselectiv rotește magnetizarea totala in planul transversal, de exemplu $I_x - S_x$, daca pulsul are faza y.
6. starea LLC este sustinuta prin aplicarea continua a unui puls radio-frecventa (RF) relativ slab (1kHz) cu frecventa de carrier egala cu media aritmetica a frecventelor de offset ale celor doi protoni I si S, facandu-i magnetic echivalenti pentru perioada de transfer $\tau_{transfer}$. Faza pulsului RF in acest caz este x.
7. in perioada de transfer $\tau_{transfer}$, ordinea de spin se degradeaza exponential si oscilatoriu, cu transfer de magnetizare catre nucleele vecine.
8. starea LLC este convertita intr-o forma de magnetizare observabila prin intreruperea campului RF si semnalul este detectat. De asemenea, se pot urmări semnalele corespunzatoare altor atomi din molecule ce indica prezenta transferului de magnetizare de la LLC.

Caracteristicile starilor LLC sunt timpul de viata mai mare decat cel al magnetizarii transversale clasice si degradarea exponentiala si oscilatorie a semnalului. Daca mecanismul de relaxare dominant este dat de cuplajul dipolar intre cei doi spini, atunci timpul de viata T_{LLC} este considerabil mai mare decat timpul de viata al relaxarii transversale T_2 ($3 < T_{LLC} < 9$).

~~SECRET DE SERVICIU~~

4

Aude Sădet  Paul Vasos

SECRET

~~SECRET DE SERVICIU~~

Frecventa de oscilatie a semnalului este egala cu constanta de cuplaj scalar J care poate fi calculata mult mai precis datorita timpului de viata prelungit al starii LLC ce creste rezolutia spectrala.

Aplicarea pulsului continuu de radio-frecventa induce echivalenta intre cei doi protoni constituinti ai LLC si genereaza in acelasi timp o ordine de spin cu durata de viata crescuta. Aceasta polarizare a distributiei spinilor poate afecta magnetizarea spinilor vecini la distante de ordinul Angstrom. Transferul de magnetizare este proportional cu $1/r^6$ unde r este distanta dintre spini ce comunica prin contact dipolar si ofera informatii de natura geometrica asupra configuratiei spatiale a atomilor. Metodele standard, NOESY si ROESY, sunt des utilizate in acest scop insa sunt limitate de timpul de viata scurt al ordinii de spin si implicit al transferului de magnetizare. Acest dezavantaj impune o distanta maxima de 5-6 Angstromi pana la care pot exista interactiuni intre nucleele vecine. Timpul de viata imbunatatit al starilor LLC poate permite extinderea regiunii spatiale in care pot fi detectati atomii la distante mai mari, crescand implicit rezolutia de determinare a structurii moleculare.

Caracteristicile transferului prin LLC au fost probate computational si experimental. Simularile au fost realizate in Matlab cu ajutorul pachetului de programe Spinach 2.2.46123. Datele experimentale au fost inregistrate cu ajutorul spectrometrului Bruker Avance II 400 MHz.

Fata de transferul clasic de tip ROE de la suma magnetizarii transversale a doi spini I si S catre un al treilea spin K , transferul de la LLC la spinul K se dovedeste mai eficient pentru timpi de corelatie superiori specifici proteinelor mari (Figura 2). Simularile si datele experimentale arata faptul ca pozitia maximului transferului de magnetizare are loc la timpi superiori pentru cazul folosirii LLC ca sursa, comparativ cu cazul clasic. De asemenea, calculele arata ca maximul transferului are valoare mai mare in cazul transferului LLC decat in cazul clasic pentru timpi de corelatie superiori specifici proteinelor mari sau mediilor vascoase. In Figura 2, se observa si dependenta unghiulara a transferului de la LLC format din doi protoni (cercuri verzi) la un al treilea proton (cercuri rosii). Transferul se anuleaza in cazul in care al treilea spin se afla pe mediatoarea segmentului ce uneste cei doi protoni ai LLC. Este figurat si cazul transferului clasic, de la suma magnetizarii protonilor (figurati cu verde) la al treilea proton (cercuri albastre). Dependenta geometrica face din metoda de transfer folosind LLC o unealta noua, utila in studiul distributiei atomilor in molecule.

Scopul acestei metode poate fi extins in directia inlocuirii atat a sursei de magnetizare, cat si a detectiei cu stari LLC. Transferul LLC \rightarrow LLC a fost probat din punct de vedere computational pentru sistemul Gly75-Gly76 din capatul C-terminal al Ubiquitinei. S-a dovedit ca transferul de magnetizare este superior atat ca intensitate, cat si ca durata (Figura 3) transferului clasic intre sumele magnetizarii transversale. Acest lucru va permite masurarea semnalelor corespunzatoare transferului de magnetizare la distante mai mari, invizibile metodelor conventionale, si imbunatatirea rezolutiei structurilor moleculare deduse cu ajutorul rezonantei magnetice.

~~SECRET DE SERVICIU~~

5

Ande Gadet Paul Vasile

REVENDICARI

OSIM
9/11.06.2021

1. Metoda de masurare a distantelor intramoleculare sau intermoleculare folosind rezonanta magnetica in stare lichida prin tehnici bazate pe coerente cu viata lunga ale spinilor nucleari, in care baza de reprezentare mecanico-cuantica a evolutiei unei perechi de spin $\frac{1}{2}$ echivalenti este baza singlet-triplet $\Phi_{ST} = \{T_{+1} = |\alpha\alpha\rangle; T_0 = N(|\alpha\beta\rangle + |\beta\alpha\rangle); S_0 = N(|\alpha\beta\rangle - |\beta\alpha\rangle); T_{-1} = |\beta\beta\rangle\}$ unde $N = 2^{-1/2}$, in care starea coerent cu durata mare de viata (LLC) este data de superpozitia dintre starile singlet S_0 si triplet T_0 cu expresia:

$$LLC = |S_0\rangle\langle T_0| + |T_0\rangle\langle S_0| \quad (\text{Ecuatia 1})$$

Ordinea de spin este creata si detectata prin:

- identificarea dintr-un spectru monodimensional a deplasarilor chimice ale celor doi protoni si a cuplajului dintre acestia.
 - polarizarea spinilor in camp magnetic este data de distributia Boltzmann si cuprinde suma magnetizarilor longitudinale a fiecarui proton din amestec.
 - transmiterea unui prim set de trei pulsuri care izoleaza componentele longitudinale ale protonilor de interes (care vor forma LLC) din care se obtine starea $I_z + S_z$;
 - transformarea acestei stari intr-o diferenta de magnetizare longitudinala $I_z - S_z$ cu ajutorul unui puls selectiv;
 - transmiterea unui puls neselectiv care roteste magnetizarea totala in plan transversal;
 - sustinerea starii LLC prin aplicarea continua a unui puls de radio-frecventa (rf) pentru a-i face magnetic echivalenti pentru un timp $\tau_{transfer}$;
 - intretinerea coerenti pe durata de timp $\tau_{transfer}$ in care ordinea de spin se degradeaza exponential si oscilatoriu cu transfer de magnetizare catre nucleele vecine;
 - transformarea starii LLC intr-o forma de magnetizare observabila prin intreruperea campului radio-frecventa si deterctarea semnalului, in care amplitudinea transferului de la LLC la nucleele vecine este invers proportionala cu distanta intre nucleele sursa si nucleele excitat, astfel ca se pot obtine date despre geometria moleculara in care se gasesc atomii;
2. Metoda de masurare a distantelor intramoleculare sau intermoleculare conform revendicarii 1, **caracterizata prin aceea ca** asigura masurarea distantelor interatomice pe un domeniu spatial mai extins pentru ROE folosind LLC, in cazul proteinelor de mari dimensiuni sau moleculelor plasate in medii vascoase.
3. Metoda de masurare a dinstelor intramoleculare sau intermoleculare conform revedincarii 1, **caracterizata prin aceea ca** este folosita atat pentru masurarea distantelor intramoleculare, cat si pentru masurarea distantelor intermoleculare, permitand descrierea structurilor complexelor biomoleculare sau proteina-ligand
4. Metoda de masurare a distantelor intramoleculare sau intermoleculare conform revendicarii 1, **caracterizata prin aceea ca** permite masurarea transferului LLC \rightarrow LLC in cadrul proteinelor, probata computational
5. Metoda de masurare a distantelor intramoleculare sau intermoleculare conform revendicarii 1,

Aude Zadet & Paul Versey

~~SECRET~~

~~SECRET DE SERVICIU~~

caracterizata prin aceea ca etapa de detectare a semnalului permite, de asemenea, urmarirea semnalelor corespunzatoare altor atomi din molecule ce indica prezenta transferului de magnetizare de la LLC.

~~SECRET DE SERVICIU~~

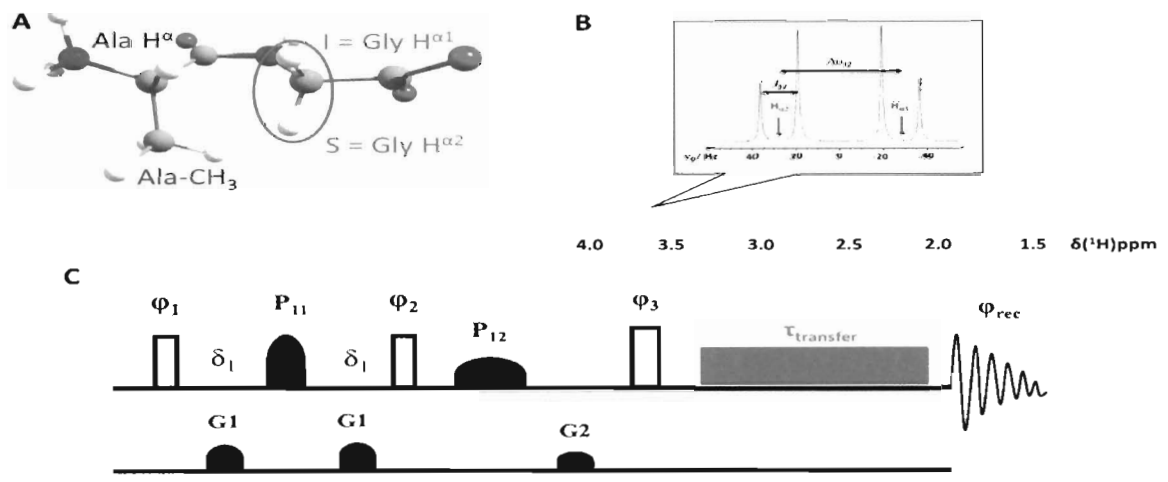
7

André Edet  Paul Vayes

NESECRET

SECRET DE SERVICIU

FIGURA 1



SECRET DE SERVICIU

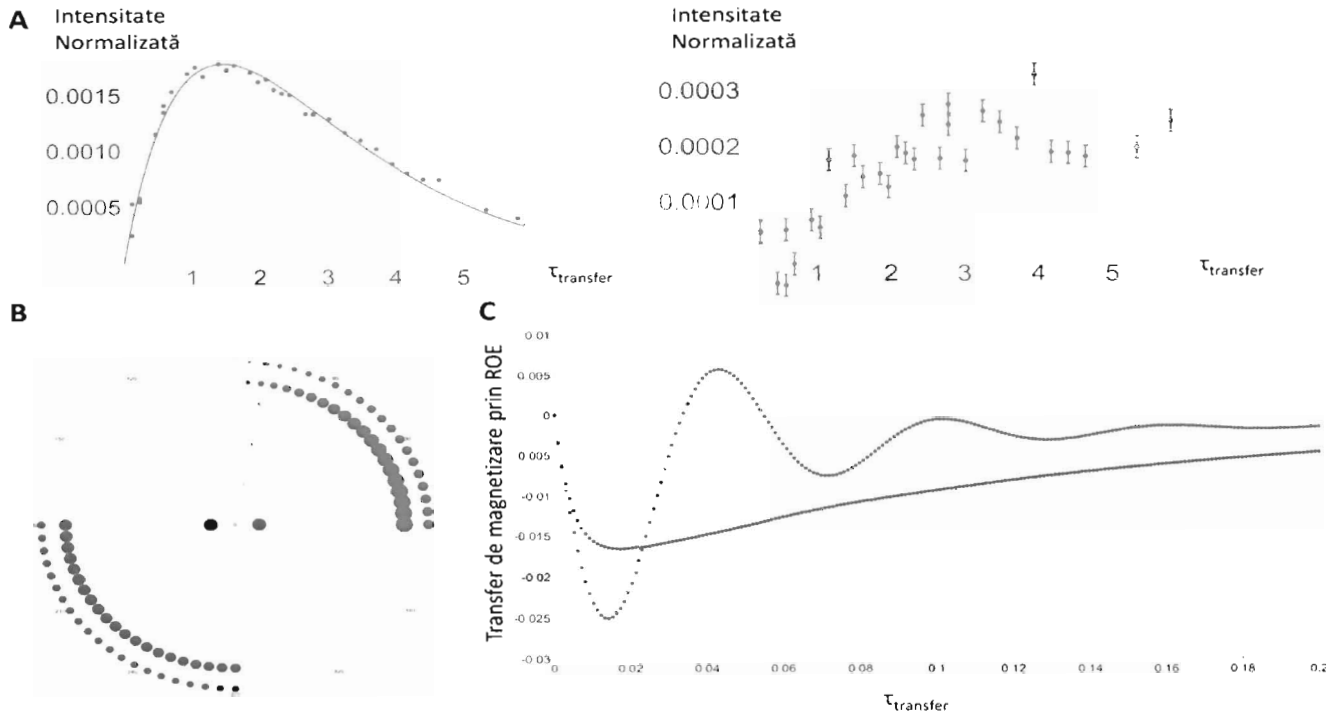
André Gadet

Paul Vaisez

NESECRET

SECRET DE SERVICIU

FIGURA 2



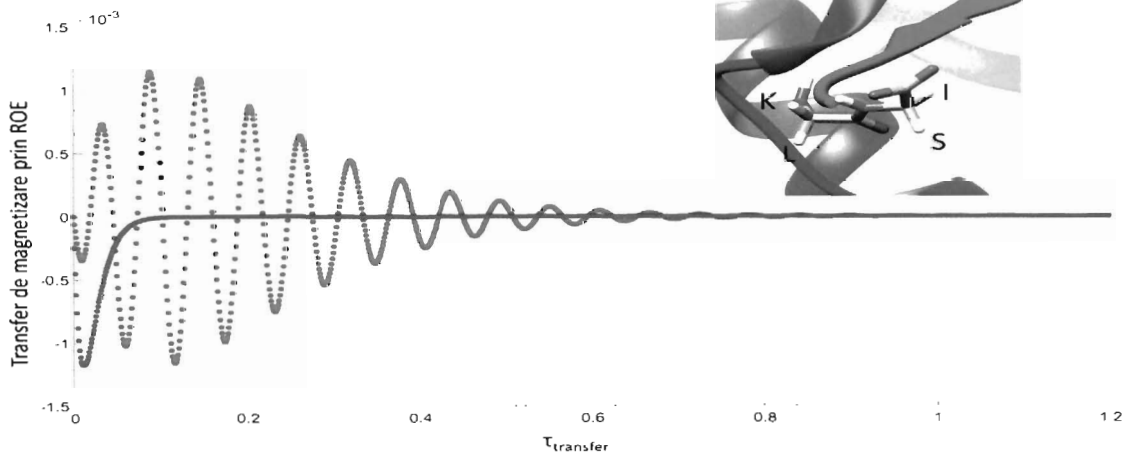
SECRET DE SERVICIU

Andrei Jankov & Paul Vasile

NESECRET

SECRET DE SERVICIU

FIGURA 3



SECRET DE SERVICIU

André Gadet & Paul Vasile