



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2023 00283

(22) Data de depozit: 07/06/2023

(41) Data publicării cererii:  
30/10/2023 BOPI nr. 10/2023

(71) Solicitant:  
• DDS DIAGNOSTIC S.R.L., STR.SEGOVIA  
NR.1, BL.C8, SC.3, AP.39, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• STAN DANA, STR.SEGOVIA, NR.1, BL.C8,  
SC.3, ET.2, AP.39, SECTOR 3,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• MATEESCU LORENA ANDREEA,  
STR.RAUL VEDEA, NR.13C, AP.2,  
BRAGADIRU, IF, RO;  
• MIRICĂ ANDREEA CRISTINA,  
STR.ANTIAERIANĂ, NR.6A-26, BL.C2, AP.6,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE BIOSENZOR PENTRU DETECȚIA  
ELECTROCHIMICĂ A CISPLATINEI DIN PROBE DE PLASMĂ  
ARTIFICIALĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biosenzor selectiv pentru detecția electrochimică a Cisplatinei (CIS) din plasmă artificială. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: caracterizare inițială a electrodului serigrafiat în soluție de feri/fero cianură de potasiu 5 mM prin metode electrochimice pe domeniul -0,2/+0,6 V, viteză de scanare de 100 mV/s, 4 cicluri, spălare a electrodului serigrafiat cu o soluție de tampon fosfat cu pH 7,4 cu uscare, funcționalizare a suprafeței electrodului de lucru de aur cu 2 μl albumină serică umană (HSA) de concentrație 1 mg/ml, prin incubare timp de 1 h la temperatura camerei, spălarea electro-

dului pentru îndepărtarea excesului de HSA, caracterizarea electrodului funcționalizat în soluție de feri/fero cianură de potasiu 5 mM, respectiv, în apă oxigenată 50 mM, pe domeniul -0,2...+0,8 V, o viteză de scanare de 250 mV/s, 1 ciclu, cu realizarea curbei de calibrare și testarea plasmei artificiale îmbogățită în concentrații detectate de CIS în domeniul 0,0006...43,2 mg/ml, biosenzorul fiind selectiv pentru detectarea unor concentrații mici de CIS.

Revendicări: 1  
Figuri: 4



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. .... a 2023 ∞ 283
Data depozit ..... 07-06-2023.....

RO 137715 A0

27

## PROCEDEU DE OBTINERE BIOSENZOR PENTRU DETECȚIA ELECTROCHIMICĂ A CISPLATINEI DIN PROBE DE PLASMĂ ARTIFICIALĂ

### DESCRIERE INVENȚIE

Invenția se referă la procedeul de obținere a unui senzor electrochimic funcționalizat cu albumina serică umană (HSA), destinat detecției unor agenți antitumorali des utilizați în practica medicală.

Cancerul este una din principale cauze de deces la nivel mondial, fiind adesea tratat cu medicamente antineoplazice cu un nivel ridicat de toxicitate. Monitorizarea personalizată a terapiei cu aceste medicamente reprezintă un deziderat, aducând în prim plan conceptul de medicină personalizată [1,2,3]. Dezvoltarea senzorilor electrochimici destinați detecției agenților antitumorali reprezintă o necesitate. Scopul biosenzorilor electrochimici dezvoltați permit monitorizarea nivelurilor plasmatiche de Cisplatină la pacienții cu boli neoplazice și administrarea de tratament personalizat. Metodele electroanalitice sunt preferate pentru analiza compușilor farmaceutici activi și a probelor biologice datorită sensibilității și selectivității ridicate. Tehnicile electrochimice sunt versatile și au sensibilitate, acuratețe și precizie ridicată, precum și un domeniu larg de detecție.

Cisplatină (CIS) este folosită încă din 1978, pentru tratamentul cancerelor ovariene, testiculare și a tumorilor solide la nivelul capului și gâtului [9]. Este un antineoplazic citostatic, un compus coordinat al platinei, ce acționează ca alchilant bifazic, inhibând selectiv și preferențial sinteza ADN-ului și mai puțin a ARN-ului, neavând specificitate de fază a ciclului celular. S-au identificat mai multe mecanisme moleculare de acțiune, inclusiv inducerea stresului oxidativ, caracterizată prin producerea de specii reactive de oxigen și peroxidarea lipidelor, blocarea ciclului celular, inhibarea proto-oncogenelor și a proteinelor anti-apoptotice și activarea căilor de apoptoză. CIS nu prezintă o legare instantanee și reversibilă de proteinele plasmatiche, însă, platina din structura sa este capabilă să se lege de proteinele plasmatiche, inclusiv albumina, transferina și  $\gamma$ -globulina. Eliminarea se realizează în principal prin urină, în primele ore rapidă, apoi foarte lentă, având un timp de înjumătățire terminal de 2-5 zile [9].

Metodele folosite în prezent pentru detecția Cisplatină se bazează pe cromatografia de lichide de înaltă performanță [18], cromatografia de lichide de ultra performanță [19], cromatografia electrocinetică micelară [20] și metode de chemiluminiscență [21].

Aceste metode prezintă unele dezavantaje, cum ar fi: timpii mari de analiză, utilizarea unor echipamente sofisticate și scumpe, a solvenților scumpi, dar și necesitatea unui personal calificat pentru manipularea echipamentelor și interpretarea rezultatelor.

Senzorul electrochimic funcționalizat cu HSA oferă multe avantaje. Unele in aceste avantaje se referă la selectivitate, sensibilitate, măsurători realizate în timp real, diagnostic rapid, cost redus și utilizarea unor cantități mici de probă.

Cisplatină este un compus redox-activ, de aceea metodele electrochimice reprezintă o alegere bună în privința detecției și determinării concentrației de Cisplatină.

Funcționalizarea electrozilor serigrafiați reprezintă un pas spre viitorul senzorilor electrochimici. În acest proces, electrozii vor avea o mai mare specificitate și sensibilitate pentru detecția moleculei de interes.

Această tehnică de funcționalizare prezintă unele avantaje precum specificitate ridicată, stabilitate, sensibilitate crescută și un cost de producție scăzut.

**Problema tehnică** pe care o rezolvă această invenție constă în detectarea unor concentrații mici de Cisplatină. Deși există alte metode detecție pe piață, cum ar fi: cromatografie de lichide de înaltă performanță, cromatografia de lichide de ultra performanță și spectrometria de absorbție atomică, aceste metode necesită personal calificat, durată mare de

analiză, cantități mai mari de probă și nu sunt disponibile publicului larg. Avantajul cu care vine tehnica noastră este reprezentat de costul mic de producție, utilizarea unor cantități mici de probă și o accesibilitate mai mare.

Funcționalizarea electrodului serigrafiat, presupune următoarele etape:

- caracterizarea inițială a electrodului în soluție de feri/fero cianură de potasiu 5 mM, prin metodele electrochimice precum voltametria ciclică (CV) pe domeniul -0.2/+0.6 V, rata de scanare fiind 100 mV, 4 cicluri, precum și spectroscopie electrochimică de impedanță (EIS);
- am funcționalizat electrodul de lucru cu 2  $\mu$ L de soluție HSA cu concentrația de 1 mg/mL; urmată de incubare timp de o ora la temperatura camerei;
- Caracterizarea electrodului după funcționalizare cu HSA în soluție de feri/fero cianură de potasiu 5 mM, prin metodele electrochimice precum CV și EIS;
- Caracterizarea după funcționalizare a electrodului în H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM prin metoda CV: domeniul -0.2/+0.8 V, rata de scanare 250 mV, 1 ciclu;
- Caracterizarea finală a electrodului cu probe de plasmă artificială îmbogățită cu diferite concentrații de Cisplatină, în soluție de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM, prin metoda CV pe domeniul -0.2/+0.8 V, rata de scanare 250 mV, 1 ciclu, pentru fiecare concentrație de Cisplatină.

Pentru această aplicație, electrodul serigrafiat este spălat cu o soluție de tampon fosfat cu pH = 7.4, lăsat la uscat, apoi se funcționalizează electrodul de lucru cu o soluție de 2  $\mu$ L HSA, de concentrație 1 mg/mL și se lasă la incubat timp de o oră.

Plasma artificială a fost îmbogățită cu concentrații cunoscute de Cisplatină: 0.0006 mg/mL, 0.001 mg/mL, 0.036 mg/mL, 0.18 mg/mL, 0.36 mg/mL, 1.8 mg/mL, 3.6 mg/mL, 10.8 mg/mL, 18 mg/mL, 25.2 mg/mL, 32.4 mg/mL și 43.2 mg/mL. Detecția concentrațiile cunoscute de Cisplatină a fost realizată într-o soluție de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50 mM. Citirea s-a realizat utilizând potențiosstatul Interface 1010E (Gamry), cu ajutorul metodei voltametrie ciclică, metoda fiind selectată ca fiind optimă pentru acest tip de aplicație.

Figurile reprezentative realizării microsenzorului conform invenției sunt următoarele:

**Fig. 1.** Modelul experimental – electrodul serigrafiat care prezintă: A. electrod de lucru cu suprafață de aur; B. contra-electrod cu suprafață de aur; C. electrod de referință de argint.

**Fig. 2.** Electrodul serigrafiat conectat la Potențiosstatul Interface 1010E (Gamry).

**Fig. 3.** Obținerea curbei de calibrare prin metoda de voltametrie ciclică a electrodului funcționalizat cu HSA.

**Fig. 4.** Curba de calibrare în funcție de concentrația de Cisplatină ( $R^2=0,956$ ).

## Exemplu:

### 1. Etapa de caracterizare electrod serigrafiat

Metoda de caracterizare a electrozilor serigrafiați cu electrodul de lucru din aur s-a realizat prin metoda electrochimică de voltametrie ciclică (CV) și spectroscopie de impedanță electrochimică (EIS) în soluție de feri/fero cianură de potasiu 5 mM:

- interval de baleiere: -0.2/0.6 V;
- viteza de scanare: 100 mV/s;

- numărul de cicluri: 4 cicluri.
- După caracterizare, electrodul se spală cu soluție de PBS, pH=7.4, și se lasă la uscat timp de 15 minute.

## 2. Procesul de funcționalizare a electrodului

Procesul de funcționalizare constă în următoarele:

- Am pipetat pe electrodul de lucru 2  $\mu\text{L}$  de soluție HSA cu concentrația de 1 mg/mL;
- Incubare timp de o ora la temperatura camerei;
- Caracterizare electrodul după funcționalizare cu HSA
  1. în soluție de feri/fero cianură de potasiu 5 mM, prin metodele electrochimice CV și EIS;
  2. în soluția de  $\text{H}_2\text{O}_2$  prin CV:
- interval de baleiere: -0.2/+0,8 V;
- viteza de scanare: 250 mV/s;
- numărul de cicluri: 1 ciclu.

## 3. Etapa de obținere a curbei de calibrare a concentrațiilor de Cisplatină

S-au realizat 12 soluții de plasmă artificială îmbogățită cu următoarele concentrații de Cisplatină:

- 0.0006 mg/mL
- 0.001 mg/mL
- 0.036 mg/mL
- 0.18 mg/mL
- 0.36 mg/mL
- 1.8 mg/mL
- 3.6 mg/mL
- 10.8 mg/mL
- 18 mg/mL
- 25.2 mg/mL
- 32.4 mg/mL
- 43.2 mg/mL

Fiecare concentrație se analizează în soluție de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de concentrație 50 mM prin metoda CV și se realizează curba de calibrare.

## REVENDICĂRI

1. Revendicarea se referă la procedeul prin care se realizează un biosenzor selectiv pentru detecția electrochimică a Cisplatinei din plasma artificială, **biosenzor caracterizat prin:** caracterizarea electrochimică inițială a senzorului prin metoda electrochimică de voltametrie ciclică (CV), baleierea potențialului între -0.2 V și +0.6 V, câte 4 cicluri în soluție feri/fero cianură de potasiu 5 mM  $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$  și  $K_3[Fe(CN)_6]$ , **urmată de** spălare cu tampon fosfat (pH=7,4), **în continuare** are loc funcționalizarea suprafeței electrodului de aur cu 2  $\mu$ L albumină serică umană (HSA) de concentrație 1 mg/mL, prin incubare timp de o oră la temperatura camerei, după care s-a îndepărtat excesul de HSA prin spălarea electrodului cu o soluție de tampon fosfat, **urmând** caracterizarea electrodului funcționalizat în soluție de feri/fero cianură de potasiu 5 mM, prin metodele electrochimice CV și EIS și în soluție  $H_2O_2$  50 mM prin înregistrarea CV prin baleierea potențialului între -0.2 V și +0,8 V și o viteză de scanare de 250 mV/s, un ciclu care în final duce la obținerea biosenzorului, **apoi** se realizează citirea diferitelor concentrații de Cisplatină, cunoscute, de la 0.0006 mg/mL la 43.2 mg/mL, prin metoda CV cu baleierea potențialului în intervalul interval de baleiere: -0.2V - +0,8V, viteza de scanare 250 mV/s și 1 ciclu.

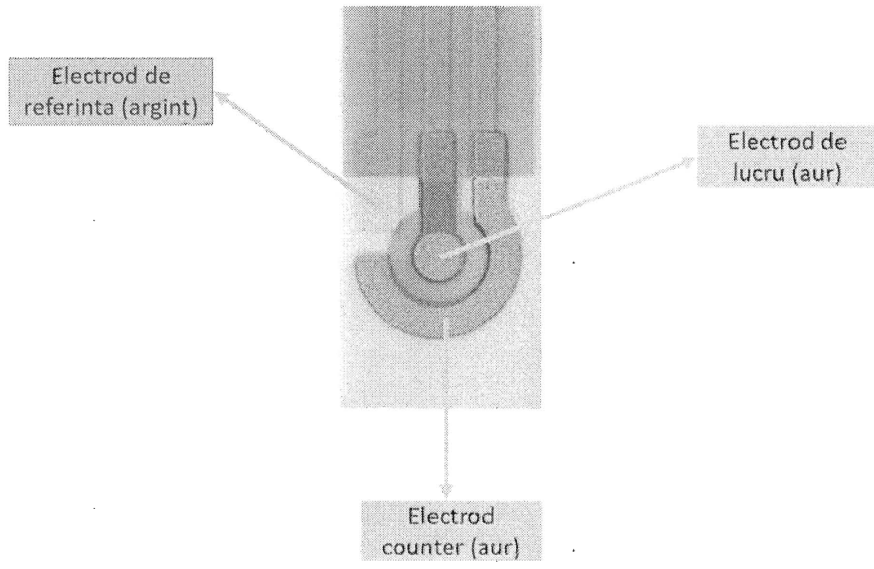


Fig. 1

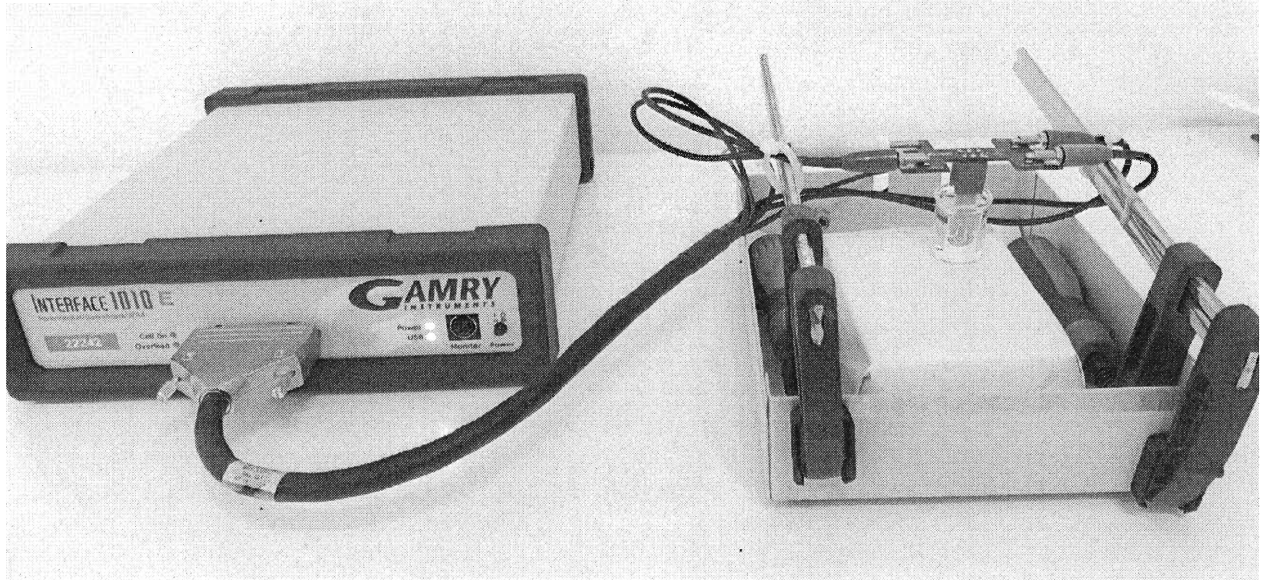


Fig. 2

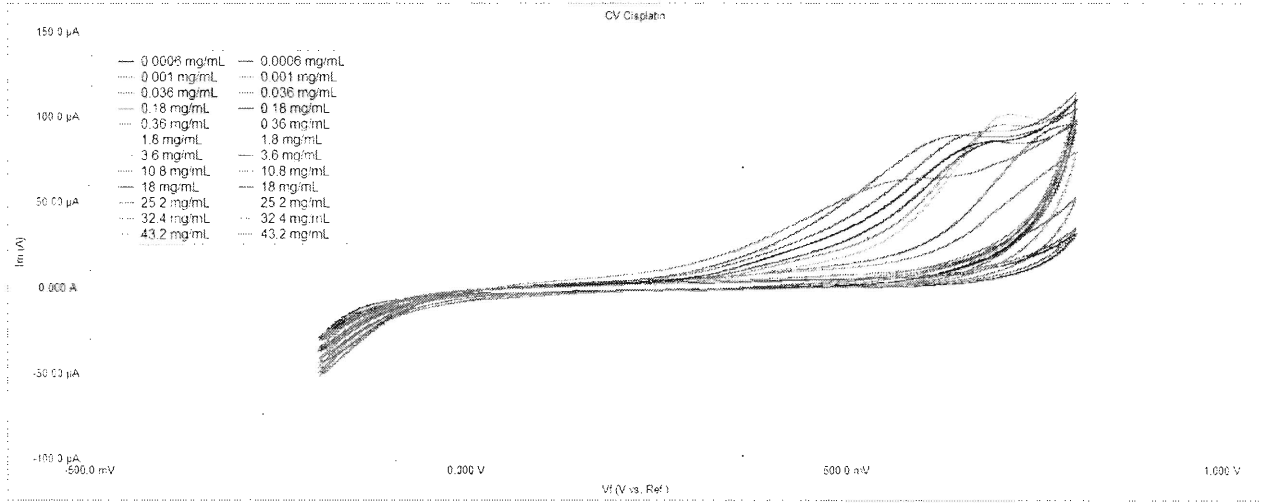
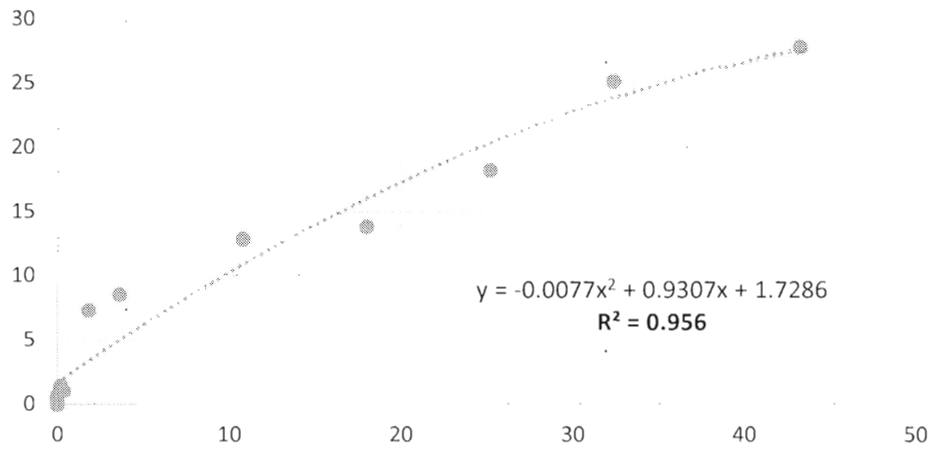


Fig. 3



Curbă calibrare concentrații de Cisplatin  
0.0006 - 43.2 mg/mL



**Fig. 4**