



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00172

(22) Data de depozit: 04/04/2022

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

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA "ALEXANDRU IOAN
CUZA" DIN IAȘI, BD. CAROL I NR. 11, IAȘI,
IS, RO

(72) Inventatori:
• LUCHIAN TUDOR, ȘOS.PĂCURARI,
NR.71, BL.478, SC.C, ET.5, AP.17, IAȘI, IS,
RO;

• MEREUTA LOREDANA, ȘOS. PĂCURARI
NR.71, BL.478, SC.C, ET.5, AP.17, IAȘI, IS,
RO;
• ASANDEI ALINA, STR.FRUMOASA, NR.1,
BL. 654, SC.B, AP.3, PARTER, IAȘI, IS, RO;
• DRAGOMIR ISABELA, STR. HOLBOCA,
NR.2B, IAȘI, IS, RO;
• BUCATARU IOANA, BD.POITIERS
NR.177, BL.60, SC.B, ET.3, AP.23, IAȘI, IS,
RO

(54) DETECȚIA CU NANOPORI PROTEICI A ANTIGENILOR
HEPATITEI B VIRALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de detecție a antigenului HBeAg din probe biologice cu aplicații în diagnosticul clinic al hepatitei B. Metoda, conform invenției, utilizează tehnica de electrofiziologie pe un sistem format dintr-un nanopor de α -hemolizină (α -HL) inserat într-un bistrat lipidic și molecule de anticorpi specifici (anti-HBeAg) cu incubarea prealabilă a moleculelor de interes timp de 2 h la temperatura camerei rezultând

complexul HbeAg-antiHBeAg, cu aplicarea unor diferențe de potențial pozitive, înregistrarea variațiilor curentului ionic datorate interacțiunilor moleculelor cu nanoporul proteic, și evaluarea informațiilor care conduc la detecția selectivă a antigenului HBeAg în proba investigată.

Revendicări: 3



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 22 01 2022
Data depozit 04-04-2022	

1

Descrierea invenției

Deteția cu nanopori proteici a antigenilor hepatitei B virale

Invenția se referă la o metodă de detecție senzitivă și selectivă a antigenului HBeAg specific hepatitei B virale, ce poate sta la baza unui nanosenzor proteic portabil util în aplicații biomedicale din domeniul bionanotehologic, precum testarea clinică și diagnosticul medical.

În prezent, procedura standard în monitorizarea infecției cu virusul hepatitei B (HBV) este reacția de polimerizare în lanț (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) în timp real, care cuantifică ADN-ul viral din nucleocapsidele eliberate în sângele pacienților infectați. Acest test este considerat sensibil și precis, dar problemele tehnice, cum ar fi rezultatele fals pozitive sau negative din cauza contaminării probei nu sunt complet excluse.¹ Mai mult, manipularea PCR necesită expertiză tehnică și personal cu înaltă pregătire, timpi mari de analiză (24h), costuri asociate mari, făcând tehnica de diagnosticare mai puțin practică pentru o utilizare în timp util, mai ales în punctele de îngrijire. Plecând de la metoda PCR, s-au dezvoltat platformele robotizate de analiză a ADN-ului HBV (de exemplu, COBAS TaqMan, COBAS AmpliPrep, Abbott Real Time HBV Detection) și platforme centrifugale microfluidice, care micșorează timpii de procesare.² Cu toate acestea, din cauza randamentului scăzut și a costului operațional ridicat, aceste metode sunt încă puțin utilizate.

Infecția cu HBV poate fi evidențiată și prin măsurarea titrurilor proteinelor secretoare ale HBV, a antigenilor (Ag) de „suprafață” (HBs) sau „precoce” (HBe). HBsAg este primul antigen serologic care poate fi detectat în ser la o săptămână după infectarea cu HBV, indicând cronicitatea când persistă mai mult de 6 luni, și este urmat la scurt timp de HBeAg. Detectarea HBeAg în sângele purtătorilor de HBV sau a pacienților cronici este asociată cu o rată ridicată de replicare virală, titruri crescute ale ADN-ului și infecțiozitate și risc semnificativ de transmitere a infecției. În schimb, un rezultat negativ HBeAg este un indiciu al replicării minime sau absenței HBV.³ Astfel, HBeAg poate fi considerat un marker pentru boala severă, detectarea lui în serul pacienților justificând inițierea imediată a terapiei antivirale, mai ales în situațiile în care evaluarea HBV prin PCR nu este ușor disponibilă. Sunt folosite în acest scop tehnici de diagnostic imunochimice, care se bazează pe interacțiunea antigen-anticorp, dintre care menționăm tehnica de analiză imunoenzimatică, precum ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), în care antigenii sunt

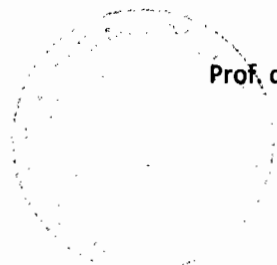
Reactor,
Prof. dr. Tudorel Toader

detectați în urma interacțiunii cu anticorpi marcați enzimatic.⁴ Această tehnică necesită etape multiple de pregătire a probei, ceea ce rezultă în timpi îndelungați până la rezultatul final, un volum mare al soluției probă și are o sensibilitate de detecție scăzută în cazul interacțiunilor slabe.

Tehnologia bazată pe nanopori biologici sau în suport solid a revoluționat detecția la nivel de singură moleculă, fiind folosită în ultima vreme ca un nou instrument puternic pentru detectarea și caracterizarea unor analiți specifici,⁵⁻⁷ cum ar fi compuși chimici sau biomolecule precum ARN și ADN, peptide și proteine. Robustețea intrinsecă și proprietățile fizico-chimice ale proteinei α -hemolizin (α -HL) secretate de *Staphylococcus aureus*⁸ o fac stabilă în condiții experimentale extreme și o recomandă ca un biosenzor ideal pentru a fi utilizat în astfel de scopuri.^{9,10} Astfel, tehnica de electrofiziologie la nivel de singură moleculă ce utilizează ca biosenzor un nanopor de α -hemolizină (α -HL) inserat într-o membrană lipidică artificială nu necesită marcarea în prealabil a moleculelor de interes, este selectivă, avantajoasă din punct de vedere economic iar rezultatele sunt obținute în timp real.

În prezent, soluția cea mai apropiată de invenția de față este folosirea nanoporilor funcționalizați cu un receptor specific (grupare chimică, proteină, anticorp) imobilizat pe suprafața nanoporului,¹¹⁻¹³ astfel că proteinele antigenice pot fi detectate în mod selectiv în urma interacțiunii cu receptorul. Acest tip de nanosenzori suferă o limitare dată de timpul îndelungat de examinare în cazul în care interacțiunile ligand-receptor sunt îndelungate și viteza de disociere mică, astfel că pentru o interacțiune ce durează câteva zeci de secunde, timpul de înregistrare se întinde pe parcursul a câteva ore. Un alt dezavantaj al acestei tehnici este acela că pentru a încorpora receptorii în structura nanosenzorilor trebuie apelat la ingineria genetică iar costurile sunt ridicate.

Scopul invenției este implementarea unei metode de detecție a antigenilor HBeAg proveniți din probe biologice, **caracterizată prin aceea că**, utilizând tehnica de electrofiziologie pentru studii la nivel de singură moleculă bazată pe un sistem format dintr-un nanopor de α -hemolizină (α -HL) inserat într-un bistrat lipidic și molecule de anticorpi specifici (anti-HBeAg) cu incubarea moleculelor de interes timp de două ore la temperatura camerei înainte de începerea fazelor metodei, formându-se complexul HBeAg-antiHBeAg, cu raportul molar cuprins între 1:1 și 1:2, în vederea diagnosticării HBV cu rapiditate și un grad mărit de specificitate.


Rector,
Prof. dr. Tudorel Toader

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția de față se referă la detecția senzitivă și selectivă, în timp real, și fără implicarea unor compuși specifici din sfera proteomicii, a prezenței proteinelor antigenice HBV într-o varietate de probe biologice, în scop medical. Soluția tehnică prezentată utilizează un nanosenzor bazat pe nanopori proteici stabili nemodificați genetic, ce face posibilă detecția prin intermediul interacțiunilor specifice dintre antigenii HBeAg și anticorpul acestora, anti-HBeAg. Totodată, concentrațiile soluțiilor necesare pentru detecția prezenței unor agenți patogeni virali este de ordinul nanomolar (10^{-9} M).

Metoda implementată pentru realizarea detecției se bazează pe discriminarea în timp real a antigenului HBeAg utilizând tehnici la nivel de singură moleculă cu ajutorul unui nanopor proteic și anticorpi anti-HBeAg. Această metodă are la bază analiza statistică a unor evenimente distincte de blocare a curentului ionic mediat de nanopor asociate interacțiunilor dintre acesta și HBeAg/anti-HBeAg prezente în soluția electrofiziologică. Raportul molar optim pentru detecția complexului molecular anticorp-antigen (anti-HBeAg:HBeAg) poate varia între 1:1 și 1:2 pentru invenția propusă.

În vederea verificării eficienței metodei de detecție a antigenului HBeAg, pentru formarea complexului molecular antigen-anticorp (HBeAg:anti-HBeAg), se propune incubarea moleculelor de interes pentru aproximativ două ore la temperatura camerei înainte de începerea fazelor metodei.

Pentru optimizarea condițiilor de capturare a moleculelor, diferența de potențial aplicată asupra sistemului lipo-proteic a fost crescută, variind în intervalul [150; 200] mV. Forța electroforetică generată de diferența de potențial aplicată reprezintă unul din factorii determinanți ai direcției, ratei de capturare și vitezei moleculelor.

Pentru a îmbunătăți raportul zgomot/semnal, implicit pentru creșterea stabilității și sensibilității metodei, semnalul original înregistrat (fluctuațiile de curent) a fost filtrat cu un filtru de tip low-pass Bessel, fixat la 7000 Hz.

Implementarea invenției prezintă următoarele avantaje: (i) detecția selectivă cu sensibilitate mare a proteinelor antigenice HBV; (ii) metoda poate fi utilizată în platforme portabile și stabile, pentru a realiza detecția în regim 'point-of-care'; (iii) este o metodă rapidă și ieftină, în rațiunea că nu necesită operațiuni costisitoare și de lungă durată (ex: modificări chimice sau

Rector,
Prof. dr. Tudorel Toader

marcare); (iv) analiza la nivel de singură moleculă se efectuează cu ușurință și nu necesită personal specializat în domeniu; (v) prezintă un randament crescut.

Exemplu de realizare

Dispozitivul folosit pentru implementarea metodei cuprinde o cuvă compartimentată în două părți (denumite convențional *trans* și *cis*, aceasta din urmă se află legată la masă), cu volume egale (aproximativ 1 ml) de soluție electrofiziologică 2 M KCl, menținută la un pH ușor bazic (pH = 8) cu soluție buffer 10 mM HEPES. Cele două compartimente sunt despărțite de un film subțire de Teflon cu o apertură (diametrul ~120 μm) în centrul său, pretratată cu o soluție hidrofobică (1:10 hexadecan n-pentan). Într-o primă etapă, se formează un bistrat lipidic obținut din difitanoil fosfatidilcolină (DPhPC) dizolvată în n-pentan, în care se va insera un singur nanopor heptameric de α-HL, după adăugarea în partea *cis* a unei cantități mici de soluție monomerică de proteină α-hemolizină. Cu ajutorul a doi electrozi Ag/Cl imersați în cele două părți ale dispozitivului și conectați la un amplificator, se aplică o diferență de potențial și se înregistrează un curent ionic mediat de nanopor. Toate înregistrările de curent ionic au fost efectuate cu o frecvență de achiziție de 50 kHz, filtrate la o frecvență de 10 kHz, și cu un gain de 5 mV/pA. Metoda se execută în condiții de presiune atmosferică și la temperatura camerei (~ 23 °C).

Fazele metodei propuse sunt următoarele: i) după inserarea în membrana lipidică a unui singur nanopor de α-HL, se adaugă în partea *cis* a dispozitivului o cantitate de ordinul nanomolar din soluția de anticorpi specifici agentului patogen căutat; ii) ulterior, peste aceasta se adaugă proba moleculară. În cazul prezenței unei infecții cu virusul hepatitei B, proba va conține proteina ce urmează a fi detectată (antigenul HBeAg).

În urma aplicării unor diferențe de potențial pozitive, se înregistrează variațiile curentului ionic datorate interacțiunilor moleculelor cu nanoporul proteic, iar evaluarea acestora permite obținerea de informații care să permită detecția selectivă a antigenului.

Prof. dr. Tudorel Toader

Bibliografie

- (1) Iloeje, U. H.; Yang, H.; Su, J.; Jen, C.; You, S.; Chen, C. Predicting Cirrhosis Risk Based on the Level of Circulating Hepatitis B Viral Load. *Gastroenterology* **2006**, *130* (3), 678–686. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.016>.
- (2) Li, L.; Miao, B.; Li, Z.; Sun, Z.; Peng, N. Sample-to-Answer Hepatitis B Virus DNA Detection from Whole Blood on a Centrifugal Microfluidic Platform with Double Rotation Axes. *ACS Sens.* **2019**, *4* (10), 2738–2745. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b01270>.
- (3) van Zonneveld, M.; Honkoop, P.; Hansen, B. E.; Niesters, H. G. M.; Murad, S. D.; de Man, R. A.; Schalm, S. W.; Janssen, H. L. A. Long-Term Follow-up of Alpha-Interferon Treatment of Patients with Chronic Hepatitis B. *Hepatology* **2004**, *39* (3), 804–810. <https://doi.org/10.1002/hep.20128>.
- (4) Kim, S.-H. ELISA for Quantitative Determination of Hepatitis B Virus Surface Antigen. *Immune Netw* **2017**, *17* (6), 451. <https://doi.org/10.4110/in.2017.17.6.451>.
- (5) Luchian, T.; Shin, S.-H.; Bayley, H. Single-Molecule Covalent Chemistry with Spatially Separated Reactants. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (32), 3766–3771. <https://doi.org/10.1002/anie.200351313>.
- (6) Shin, S.-H.; Luchian, T.; Cheley, S.; Braha, O.; Bayley, H. Kinetics of a Reversible Covalent-Bond-Forming Reaction Observed at the Single-Molecule Level. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41* (19), 3707–3709. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20021004\)41:19<3707::AID-ANIE3707>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20021004)41:19<3707::AID-ANIE3707>3.0.CO;2-5).
- (7) Gu, L.-Q.; Braha, O.; Conlan, S.; Cheley, S.; Bayley, H. Stochastic Sensing of Organic Analytes by a Pore-Forming Protein Containing a Molecular Adapter. *Nature* **1999**, *398* (6729), 686–690. <https://doi.org/10.1038/19491>.
- (8) Song, L.; Hobaugh, M. R.; Shustak, C.; Cheley, S.; Bayley, H.; Gouaux, J. E. Structure of Staphylococcal α -Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore. *Science* **1996**, *274* (5294), 1859–1865. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1859>.
- (9) Akeson, M.; Branton, D.; Kasianowicz, J. J.; Brandin, E.; Deamer, D. W. Microsecond Time-Scale Discrimination Among Polycytidylic Acid, Polyadenylic Acid, and Polyuridylic Acid as Homopolymers or as Segments Within Single RNA Molecules. *Biophysical Journal* **1999**, *77* (6), 3227–3233. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77153-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77153-5).
- (10) Asandei, A.; Di Muccio, G.; Schiopu, I.; Mereuta, L.; Dragomir, I. S.; Chinappi, M.; Luchian, T. Nanopore-Based Protein Sequencing Using Biopores: Current Achievements and Open Challenges. *Small Methods* **2020**, 1900595. <https://doi.org/10.1002/smt.201900595>.
- (11) Wei, R.; Gatterdam, V.; Wieneke, R.; Tampé, R.; Rant, U. Stochastic Sensing of Proteins with Receptor-Modified Solid-State Nanopores. *Nature Nanotech* **2012**, *7* (4), 257–263. <https://doi.org/10.1038/nnano.2012.24>.
- (12) Yusko, E. C.; Johnson, J. M.; Majd, S.; Prangko, P.; Rollings, R. C.; Li, J.; Yang, J.; Mayer, M. Controlling Protein Translocation through Nanopores with Bio-Inspired Fluid Walls. *Nature Nanotech* **2011**, *6* (4), 253–260. <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.12>.
- (13) Takakura, T.; Yanagi, I.; Goto, Y.; Ishige, Y.; Kohara, Y. Single-Molecule Detection of Proteins with Antigen-Antibody Interaction Using Resistive-Pulse Sensing of Submicron Latex Particles. *Appl. Phys. Lett.* **2016**, *108* (12), 123701. <https://doi.org/10.1063/1.4944641>.

Revendicări

1. Detecția cu nanopori proteici a antigenilor hepatitei B virale, **caracterizată prin aceea că**, utilizând tehnica de electrofiziologie pentru studii la nivel de singură moleculă bazată pe un sistem format dintr-un nanopor de α -hemolizină (α -HL) inserat într-un bistrat lipidic și molecule de anticorpi specifici (anti-HBeAg), cu incubarea moleculelor de interes timp de două ore la temperatura camerei înainte de începerea fazelor metodei, formându-se complexul HBeAg-antiHBeAg, cu raportul molar cuprins între 1:1 și 1:2,
2. Detecția cu nanopori proteici a antigenilor hepatitei B virale, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, analiza semnalelor înregistrate cu ajutorul nanoporului α -HL caracteristice interacțiunilor specifice dintre antigenii HBeAg și anticorpului acestuia oferă posibilitatea obținerii de informații care să determine prezența antigenului în proba investigată.
3. Detecția cu nanopori proteici a antigenilor hepatitei B virale, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, pentru optimizarea condițiilor de capturare a moleculelor, diferența de potențial aplicată asupra sistemului lipo-proteic a fost crescută, variind în intervalul [150; 200] mV, și semnalul original înregistrat a fost filtrat cu un filtru de tip low-pass Bessel, fixat la 7000 Hz.



Prof. dr. Tudorel Toader
Rector