

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00284

(22) Data de depozit: 24/05/2022

(41) Data publicării cererii:
29/11/2023 BOPI nr. 11/2023

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

(72) Inventatori:
• ENACHE TEODOR ADRIAN, SAT NANOV,
COMUNA NANOV, TR, RO;

• OPREA BRATU DANIELA,
STR.SURĂNEȘI, NR.4, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BUNEA MIHAELA CRISTINA,
STR.RĂMNICU VÂLCEA, NR.26, BL.15B,
SC.1, ET.8, AP.52, BUCUREȘTI, B, RO;
• BEREGOI MIHAELA, STR.NOVACI,
NR.12, BL.P61, SC.1, ET.2, AP.7,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• ENULESCU MARIA MONICA,
STR. DESPINA DOAMNA, NR.20,
CURTEA DE ARGEȘ, AG, RO

(54) SUBSTRAT NANOSTRUCTURAT PENTRU CREȘTEREA
ȘI TRANSPLANTAREA CULTURILOR CELULARE
ȘI PROCEDEUL DE FABRICARE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un substrat nanostructurat pentru creșterea și transplantarea culturilor celulare și la procedeul de fabricare. Substratul conform invenției este alcătuit dintr-o rețea de fibre nanometrice depuse pe o membrană polimerică poroasă adezivă alcătuită dintr-o rețea de fibre micrometrice. Procedeul conform invenției pornește de la o membrană polimerică adezivă, de grosime micrometrică, primul pas fiind prepararea acesteia pentru depunerea de fibre electrofilate prin integrarea într-un circuit închis ce asigură formarea câmpului electric necesar procesului de electrofilare, urmat de electrofilarea rețelei de fibre polimerice nanostructurate peste această membrană, ajustând parametrii de proces astfel încât să se obțină o densitate crescută a fibrelor și un diametru adecvat, de sub 200nm, al acestora, folosind o soluție de nylon 6/6 dizolvat în acid formic la o concentrație de 17%, acești pași fiind urmați de o etapă intermediară în care ansamblul de fibre electrofilate/membrană polimerică este tratat termic la 100°C timp de 2 ore pentru eliminarea reziduurilor de solvent din fibre, urmată de o ultimă etapă în care suprafața acoperită cu fibrele electrofilate este supusă unui tratament cu soluție de polilisină de concentrație 0.1%, prin imersare și uscare, pentru creșterea adeziunii celulare.

Revendicări: 2

Figuri: 3

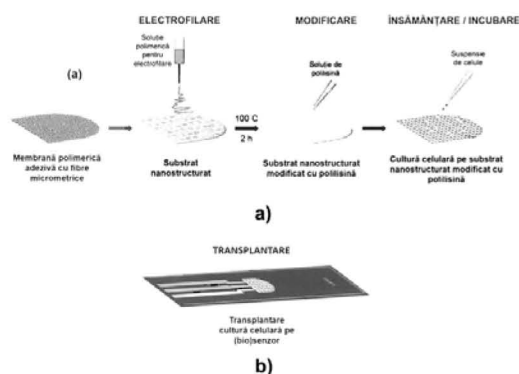


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. <i>e 2022 00284</i>
Data depozit <i>24-05-2022</i>

RO 137777 A2

30

DESCRIEREA BREVETULUI DE INVENȚIE

Titlu:

**Substrat nanostructurat pentru creșterea și transplantarea culturilor celulare și
procedeul de fabricare**

Elaborat de:

**Teodor Adrian Enache, Daniela Bratu Oprea, Mihaela Cristina Bunea, Mihaela
Beregoi, Monica Enculescu**

Prezența invenției descrie un substrat nanostructurat alcătuit din fibre polimerice nanometrice electrofilate cu rol de suport pentru creșterea de celulele vii, ce poate fi utilizat în combinație cu senzori sau biosenzori electrochimici, și procedeul prin care se poate obține acesta. Conform invenției, substratul nanostructurat este alcătuit dintr-o rețea de fibre nanometrice suprapusă peste o membrană polimerică cu proprietăți adezive alcătuită dintr-o rețea de fibre micrometrice, care permite transplantarea culturilor celulare crescute în condiții de laborator pe suprafața senzorilor sau biosenzorilor electrochimici planari în vederea monitorizării moleculelor de interes biologic produse de celule.

Un senzor electrochimic este un dispozitiv format dintr-un transductor (electrodul de lucru) ce transformă interacția cu analitul de interes într-un răspuns electronic măsurabil [1]. În cazul unui biosenzor electrochimic analitul de interes reacționează cu un element biologic (enzima, biomoleculă, anticorp, celule, țesut, etc) imobilizat în vecinătatea transductorului care transformă reacția chimică rezultată într-un răspuns electronic măsurabil [2].

Măsurarea răspunsului electronic necesită o celulă electrochimică formată din trei electrozi plasați în aceeași soluție de electrolit: electrodul de lucru (transductorul), ~~contra~~electrodul (electrodul auxiliar) și electrodul de referință [3]. În timpul măsurătorilor, fluxul de sarcină



(curent) apare între electrodul de lucru și contraelectrod, în timp ce potențialul electrodului de lucru este măsurat în raport cu electrodul de referință [4]. Necesitatea reducerii dimensiunii celulei electrochimice a dus la apariția electrozilor planari prin fabricarea celor trei electrozi, prin tehnici de serigrafie sau litografie, pe o singură suprafață [5].

Din cauza faptului că numărul de molecule biologice produse și eliberate de celulele dintr-o cultura este redus în raport cu volumul mediului celular în care se află cultura, pentru monitorizarea analitică a moleculelor de interes biologic produse de celule folosind senzori sau biosenzori electrochimici este necesară creșterea/cultivarea culturii celulare pe suprafața sensorului sau biosenzorului utilizat. Astfel, una din problemele tehnice ce poate apărea în dezvoltarea unui astfel de sistem este degradarea sensorului sau a biosenzorului în timpul creșterii culturii celulare care necesita un timp de cel puțin 24 h, în condiții de umiditate, 5% CO₂ și o temperatură de 37 °C [6].

O altă problemă majoră ce poate apărea în timpul măsurătorilor este reprezentată de faptul că fluxul de sarcină dintre electrodul de lucru și contraelectrod poate afecta viabilitatea celulelor din cultură și influența în mod negativ rezultatele obținute [7].

Rezolvarea acestor probleme presupune atât creșterea separată a culturii celulare, urmată de transplantarea pe suprafața sensorului/biosenzorului, cât și distanțarea acesteia de suprafața menținând totodată vecinătatea necesară detecției. Acest lucru presupune creșterea culturii pe un suport transplantabil care să permită moleculelor produse de celule să difuzeze local pe suprafața sensorului sau a biosenzorului pentru a putea fi detectate.

Electrofilarea este o metodă prin care se poate obține un astfel de suport de microfibre polimerice cu diametre submicronice sau chiar nanometrice [8]. Metoda nu necesită procese chimice complexe și este potrivită pentru producerea de fibre cu morfologii și funcționalități diferite. Generarea fibrelor are loc prin încărcarea electrostatică a soluției polimerice aflate într-un câmp cu intensitate de ordinul 1 kV/cm și colectarea acestora pe un conductor [9].



Această metodă este simplă, scalabilă la nivel industrial, are costuri reduse și permite un control ridicat asupra proprietăților fibrelor prin modificări ale unor parametri de proces ușor de controlat cum ar fi umiditatea, temperatura, concentrația polimerului etc. [10]. Mai mult, fibrele obținute prin electrofilare pot fi colectate pe diverse suprafețe, fapt ce constituie o rezolvare a problemelor tehnice privind monitorizarea analitică a moleculelor de interes biologic produse de celule folosind senzori sau biosenzori electrochimici.

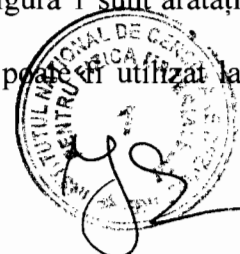
Soluția tehnica descrisă în prezenta cerere reprezintă un substrat nanostructurat pentru cultivarea și transplantarea culturilor celulare pe suprafața senzorilor sau biosenzorilor electrochimici, împreună cu procedeul de fabricare al acestuia care constă în interconectare a două componente:

- (1) o rețea de fibre polimerice electrofilate, de dimensiuni nanometrice, pentru asigurarea condițiilor biologice necesare dezvoltării și proliferării normale a culturii celulare;
- (2) o membrană polimerică cu proprietăți adezive alcătuită dintr-o rețea de fibre micrometrice, pentru asigurarea integrității structurale a substratului și a transferului culturii celulare

Conform invenției, substratul microstructurat este fabricat prin electrofilarea componentei (1) deasupra componentei (2).

Avantajul acestei soluții este că rețeaua de fibre polimerice electrofilate, componenta (1), asigură un mediu propice dezvoltării culturilor celulare în condiții de laborator iar membrana polimerică (2) asigură integritatea substratului nanostructurat fără a împiedica difuzia moleculelor de interes biologic, produse de cultura celulară, la suprafața senzorului sau biosenzorului pe care va fi transplantată cultura celulară.

În cele ce urmează se prezintă un exemplu de realizare a invenției. În Figura 1 sunt arătate schematic pașii procesului de obținere a unui substrat nanostructurat ce poate fi utilizat la



integrarea unei culturi celulare într-un sistem de detecție electrochimică sub forma unui senzor sau biosenzor. Imagini de microscopie electronică de baleiaj (SEM) și optice ale substratului nanostructurat după fiecare etapă de preparare sunt prezentate în Figurile 2 și 3. Astfel, pornind de la o membrană polimerică adezivă, de grosime micrometrică, primul pas este prepararea acesteia pentru depunerea de fibre electrofilate prin integrarea într-un circuit închis ce asigură formarea câmpului electric necesar procesului de electrofilare. Următorul pas este electrofilarea rețelei de fibre polimerice nanometrice peste această membrană ajustând parametrii de proces astfel încât să se obțină o densitate crescută de fibre și un diametru adecvat al fibrelor (sub 200nm), folosind o soluție de nylon 6/6 dizolvat în acid formic la o concentrație de 17%, o tensiune de 25 kV, o distanță spinareță-colector de 20 cm, un debit de alimentare de 0.1 ml/h și o durată de colectare de 1,5 h. Ca o etapă intermediară, ansamblul fibre electrofilate/membrană polimerică a fost tratat termic în cuptor, la 100°C timp de 2 h pentru eliminarea rezidurilor de solvent (acid formic) din fibre, ce poate influența negativ dezvoltarea celulelor. În ultima etapă de fabricare, suprafața acoperită de fibrele electrofilate este supusă unui tratament cu soluție de polilisină de concentrație 0.1%, prin imersare și uscare, pentru creșterea adeziunii celulare.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje: (i) eliminarea riscului de deteriorare a senzorului sau biosenzorului în timpul dezvoltării culturii celulare pe suprafață, (ii) eliminarea riscului de deteriorare a culturii celulare în timpul măsurătorilor electrochimice, (iii) reducerea timpului de dezvoltare a platformelor senzoriale.

Bibliografie:

- [1] G. Maduraiveeran, M. Sasidharan, V. Ganesan, Electrochemical sensor and biosensor platforms based on advanced nanomaterials for biological and biomedical applications, Biosens. Bioelectron. 103 (2018) 113–129.



- [2] N.J. Ronkainen, H.B. Halsall, W.R. Heineman, Electrochemical biosensors, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 1747–1763. <https://doi.org/10.1039/B714449K>.
- [3] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electroanalysis*, Oxford University Press, 1998..
- [4] C.M.A. Brett, A.M.O. Brett, *Electrochemistry: principles, methods, and applications*, Oxford University Press Oxford, 1993.
- [5] O.D. Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J.A. Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta*. 73 (2007) 202–219
- [6] C. D. Helgason and C. L. Miller, *Basic Cell Culture Protocols*, Volume 290 in *METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY*, 2005, Humana Press,
- [7] S. Halldorsson, E. Lucumi, R. Gómez-Sjöberg, R.M.T. Fleming, Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices, *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 218–231.
- [8] S. Agarwal, J.H. Wendorff, A. Greiner, Use of electrospinning technique for biomedical applications, *Polymer (Guildf)*. 49 (2008) 5603–5621.
- [9] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 325–347.
- [10] D. Li, Y. Xia, Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel?, *Adv. Mater.* 16 (2004) 1151–1170.



Revendicări

1. Substrat nanostructurat pentru creșterea culturilor celulare și transplantarea acestora pe suprafața senzorilor sau biosenzorilor electrochimici în vederea detecției electrochimice a compușilor moleculari de interes biologic produși de celule, caracterizat prin aceea că este alcătuit dintr-o rețea de fibre nanometrice depuse pe o membrană polimerică poroasă adezivă alcătuită din rețea de fibre micrometrice.
2. Procedeu de obținere a substratului nanostructurat din revendicarea 1 prin depunerea unei rețele de fibre polimerice nanometrice deasupra unei membrane poroase adezivă formată din fibre micrometrice folosind tehnica de electrofilare.



FIGURI EXPLICATIVE PENTRU INVENȚIE:

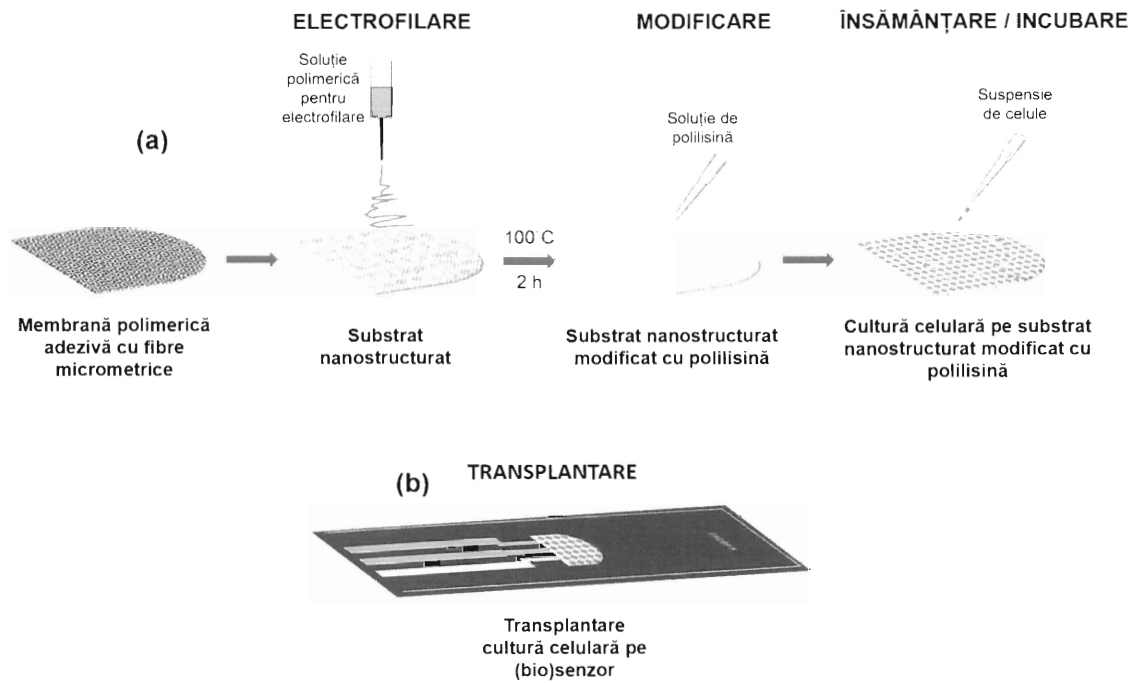


Figura 1 Etapele fabricării substratului nanostructurat cu rol de suport pentru creșterea de celulele vii și integrarea acestora într-un sistem de detecție electrochimică constituit de un senzor sau un biosenzor



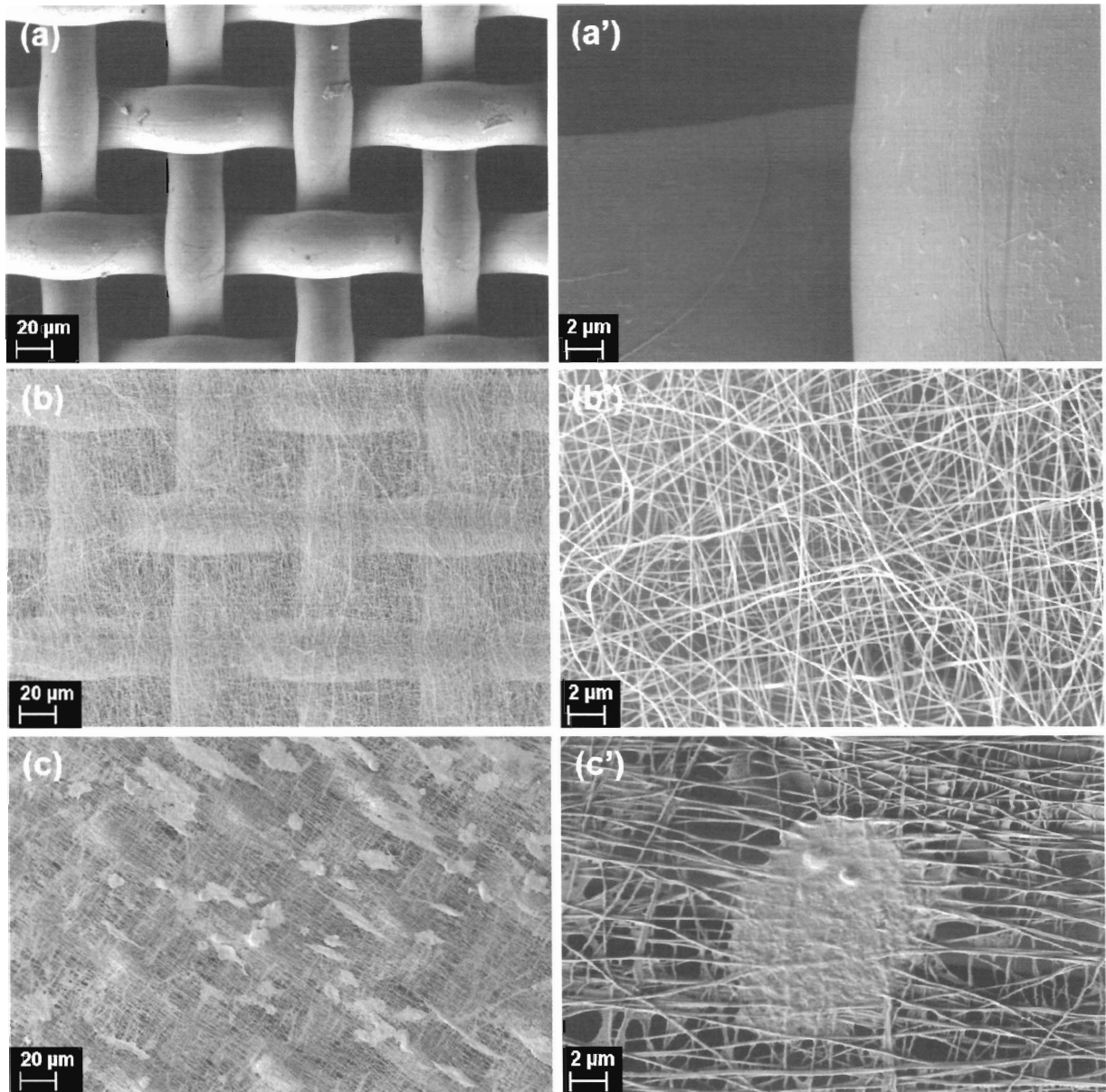


Figura 2 . Imagini de microscopie electronică de baleiaj (SEM) ale (a) membranei poroase, (b) substratului nanostructurat si (c) celulelor B16F10 crescute pe suprafata substratului nanostructurat



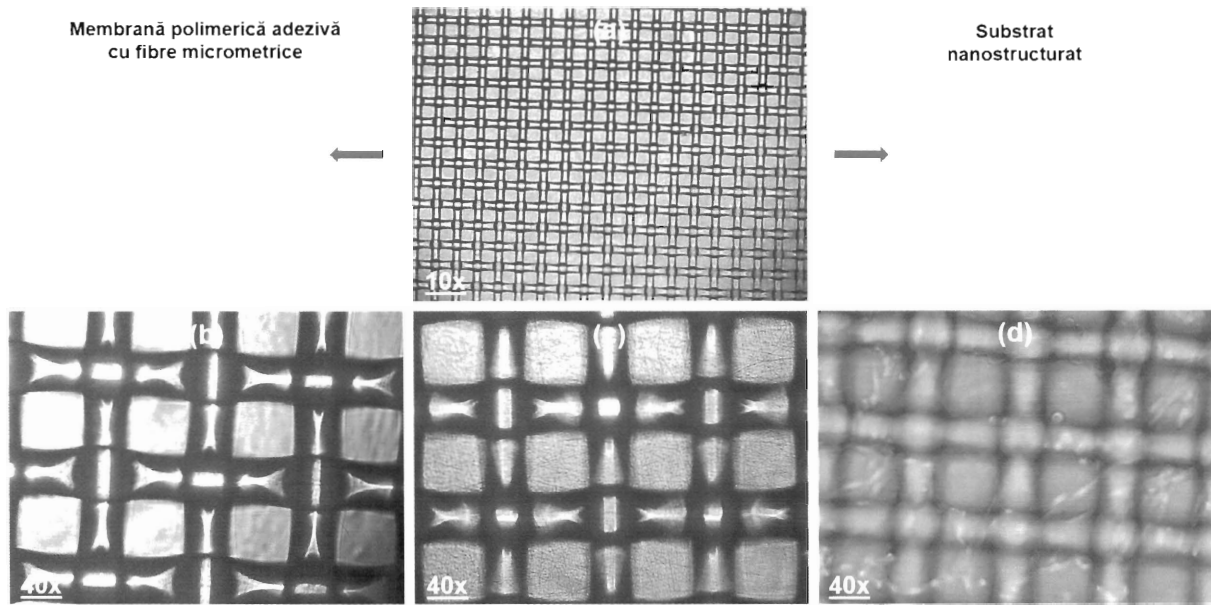


Figura 3 . Imagini optice ale (a, b) membranei poroase, (c) substratului nanostructurat si (d) celulelor B16F10 crescute pe suprafața substratului nanostructurat

