



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00647**

(22) Data de depozit: **18/10/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/04/2024 BOPI nr. **4/2024**

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

(72) Inventatori:
• **CRIȘAN DANIEL NICOLAE, STR.MIERLEI,
NR.16, MĂGURELE, IF, RO;**

• **IGNAT BARSAN MĂDĂLINA MARIA,
STR. CRIZANTEMELOR, NR.21A, ET.2,
AP.6, MĂGURELE, IF, RO;**
• **ONEA MELANIA LOREDANA,
STR.PARCULUI, NR.3, BL.G2, SC.4, AP.7,
MOTRU, GJ, RO;**
• **BRANCO LEOTE RICARDO JOSE,
STR.FIZICIENILOR, NR.40A, AP.1,
MĂGURELE, IF, RO**

(54) **METODĂ DE GREFARE A NANOPARTICULELOR DE AUR
CU POLIHIDRAZIDE CU APLICAȚII ÎN BIOCONJUGAREA
ACESTORA CU ENZIME**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor nanoparticule de Au (AuNP) funcționalizate cu polihidrazide utilizate în dezvoltarea de biosenzori. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: dizolvare polihidrazidă în solvent organic, la concentrații de 0,1...50 mM, dizolvare acid cloroauric în apă la concentrații de 0,1...15,0 mM, cu menținere unui raport hidrazide/aur de 3,3/1, adăugarea treptată a soluției de acid cloroauric în soluția de polimer sub amestecare, timp de 5...60 min., colectare AuNP grefate cu poli-

hidrazide prin centrifugare, purificare și imobilizarea biomoleculilor pe AuNP grefate cu polihidrazide în soluție și aplicare/dispersare pe suprafețe, prin intermediul unor agenți de activare, rezultând bioconjugate sub formă de matrici polimerice cu structură conservată și activitate pe termen lung adecvate pentru utilizare ca biosenzori.

Revendicări: 2
Figuri: 3

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.	RO 2022 00647
Data depozit	18-10-2022

24

DESCRIEREA BREVETULUI DE INVENȚIE

Titlu: Metodă de grefare a nanoparticulelor de aur cu polihidrazide cu aplicații în bioconjugarea acestora cu enzime.

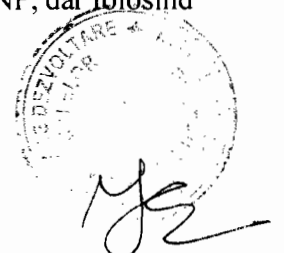
Elaborat de: Crișan Daniel Nicolae, Ignat- Bârsan Mădălina-Maria, Onea Melania Loredana, Leote Branco Ricardo Jose

Prezenta invenție se referă la o metodă de sinteză a unor nanoparticule de aur (AuNP) grefate „in-situ” cu polihidrazide prin reducerea acidului cloroauric cu poli(4-etinilbenzohidrazidă) și bioconjugarea cu enzime prin intermediul agenților de activare 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil) carbodiimidă și N-hidroxisuccinimidă (EDC/NHS).

Metodele de preparare a AuNP grefate cu polimeri implică în general sinteza în prealabil a AuNP stabilizate cu citrat (metoda Turkevich) și înlocuirea legăturilor ionice metal-ligand cu legături covalente metal-tiol. Aceste metode impun necesitatea prezenței unor grupări tiol de regulă la capetele polimerului.

Metode brevetate anterior (**US9382346B2**) fac referire la polimerizarea alchenelor în prezența unor agenți de transfer de tip tritiocarbonat și „contactarea” polimerului astfel obținut de AuNP sintetizate în mod independent de reacția de polimerizare, cu aplicații în funcționalizarea acestora și utilizarea lor ca agenți terapeutici și/sau de localizare în medicină. Polimerii brevetăți includ o largă varietate de grupări funcționale, dar nu includ și categoria hidrazinelor și a hidrazidelor. Un alt procedeu (**WO2008078970A1**) descrie obținerea in situ de AuNP prin intermediul unor agenți reducători ai acidului cloroauric, pe un substrat, într-un film polimeric anionic sau cationic, ca metodă de integrare și preservare a activității proteinelor pe suprafața unor filme prin intermediul AuNP.

Prezenta invenție diferă de metodele descrise mai sus prin următoarele aspecte și tehnicalități. Polimerul folosit în această metodă este o polihidrazidă sintetizată și nepublicată anterior. Niciunul din brevetele anterioare nu acoperă folosirea polihidrazidelor în formarea de AuNP sau de orice alt fel de nanoparticule metalice. Brevetele anterioare fie folosesc AuNP presintetizate și folosesc contactarea prin atomii de sulf, fie sintetizează in-situ AuNP, dar folosind



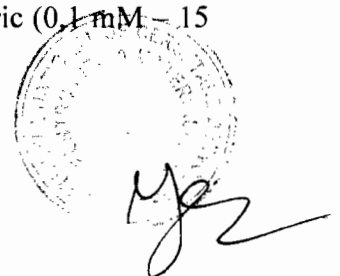
agenți de reducere clasici, pe când metoda prezentată folosește polimerul în sine ca agent reducător și contactarea de AuNP prin hidrazide. Un alt aspect inovator este că reacția are loc în soluție versus într-un film polimeric. Astfel, imobilizarea biomoleculelor pe AuNP grefate cu polihidrazide se poate face în soluție și apoi aplica/dispersa în diverse arhitecturi pe diferite suprafețe, spre deosebire de sistemul bidimensional al suprafețelor de filme polimerice.

Invenția prezintă următoarele avantaje: i) reducerea numărului de pași necesari pentru obținerea de AuNP grefate cu polimeri, implicit și o reducere a costurilor cu sinteza și materialele utilizate; ii) procedeul permite imobilizarea unei game largi de proteine pe AuNP functionalizate cu polihidrazide, cu conservarea structurii și activității acestora pe timp îndelungat comparativ cu sistemele pe bază de polimer liber sau AuNP negrefate; iii) procedeul în ansamblu, permite utilizarea AuNP grefate cu polihidrazide pe o varietate de suprafețe și substraturi, prezentând un avantaj important în aplicațiile acestora în dezvoltarea de noi biodispozitive.

Metoda conform invenției rezolvă dificultățile de obținere a unor AuNP grefate cu polihidrazide și bioconjugarea unor enzime pe suprafața acestora, și presupune următoarele etape:

- Dizolvarea polihidrazidei într-un solvent organic miscibil cu apa, la concentrații între 0,1 mM – 50 mM;
- Dizolvarea acidului cloroauric în apă la concentrații de 0,1 mM – 15,0 mM, păstrând o proporție de cel mult 3,3:1 (hidrazide – aur);
- Adăugarea treptată a soluției de acid cloroauric în soluția de polimer aflată sub amestecare, timp de 5-60 minute, urmata de colectarea AuNP grefate cu polihidrazide nepurificate prin centrifugarea soluției;
- Purificarea prin suspendarea AuNP grefate cu polihidrazide în solvent organic miscibil cu apa (de preferat același cu cel utilizat în etapa 1), urmată de colectarea AuNP grefate cu polihidrazide purificate prin centrifugarea soluției;
- Bioconjugarea enzimelor pe AuNP grefate cu polihidrazide prin intermediul agenților de activare EDC/NHS în soluție sau pe suprafețe.

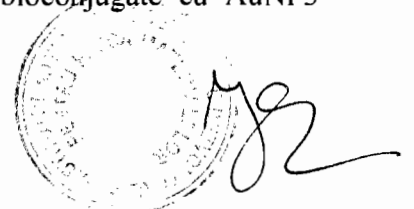
Se dă în continuare un exemplu de aplicare a metodei cu **Figura 1** reprezentând schema generală a metodei de obținere a nanoparticulelor grefate cu polihidrazide și bioconjugarea acestora cu enzime. În prima etapă de sinteză, o soluție apoasă de acid cloroauric (0,1 mM – 15



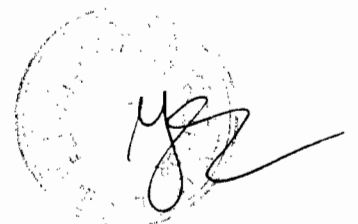
mM) este adăugată treptat unei soluții organice de polimer (0,1 mM – 50 mM) aflată sub agitare (aproximativ 10000 rpm). Formarea AuNP grefate cu polihidrazide are loc prin reducerea aurului din acidul cloroauric, grupările hidrazide asigurând sursa de electroni necesară, fie prin 2 sau 4 electroni per grupare hidrazidă, nefiind necesar un agent reducător alternativ. În a doua etapă a metodei, AuNP grefate cu polihidrazide purificate se pot folosi pentru bioconjugare, fie în soluție, fie pe suprafețe, cu biomolecule, e.g. enzime, prin reacția chimică de condensare între grupările hidrazide și grupări carboxilice activate cu EDC/NHS sau alți agenți de activare similari.

Figura 2 reprezintă imagini de spectroscopie electronică de baleiaj care confirmă prezența de AuNP grefate cu polihidrazide și care validează metoda brevetată. Se observă formarea unor matrici polimerice în care nanoparticule de aur de formă sferoidală, cu dimensiuni între 10-40 nm, dispersate uniform în întregimea matricei și complet înconjurată de polimer. Nu se observă AuNP izolate de matricea polimerică, confirmând coordinarea aurului concomitent cu reacția de reducere redox a Au^{3+} în prezența hidrazilor.

Figura 3 reprezintă variația sensibilității unui biosenzor amperometric (obținut utilizând bioconjugate de AuNP și o enzimă immobilizate pe suprafața unui electrod de Au) cu tipul de AuNP utilizate, unde: AuNP1- AuNP stabilizate în citrat, AuNP2 – AuNP grefate cu polihidrazide în absența EDC/NHS și AuNP3- AuNP grefate cu polihidrazide în prezența EDC/NHS; insertul reprezintă răspunsul cronoamperometric tipic al biosenzorului în prezența substratului enzimatic. Biosenzorul enzimatic a fost construit utilizând bioconjugate de AuNP și o enzimă, bioconjugat format in situ pe suprafața electrodului de Au prin picurarea împreună în volume egale a AuNP (1% w/v soluție apoasă), enzimă (1% w/v soluție apoasă) și agenții de activare și cuplare EDC/NHS (1% w/v soluție în dimetilformamidă și respectiv 4% w/v soluție apoasă). Volumul total de amestec AuNP, enzimă și agenți de activare a fost în exemplul dat de 0.4 mL cm^{-2} . Analiza electrochimică s-a realizat pe biosenzori obținuți utilizând bioconjugate enzimatic pe baza de AuNP3 și pe biosenzori pe bază de bioconjugate cu AuNP1 și 2 care au fost utilizați ca și control. Această analiză s-a realizat luând în considerare sensibilitatea biosenzorilor obținuți utilizând cele trei feluri de bioconjugate mai sus descrise, evaluată în mod amperometric la un potențial adecvat care permite conversia și monitorizarea electrochimică a reacției enzimatic de conversie a substratului enzimatic în produs de reacție (exemplificat în insertul din Figura 3). Astfel, se poate observa o sensibilitate net superioară a biosenzorului pe bază de bioconjugate cu AuNP3



comparativ cu ceilalți doi biosenzori pe bază de bioconjugate cu AuNP1 și AuNP2, ceea ce poate fi direct corelată cu o cantitate mai mare de enzimă prezentă pe suprafața electrodului și cu o conformație favorabilă a acesteia în bioconjugat.

A handwritten signature in black ink is written over a circular, faint stamp. The signature is stylized and appears to be 'M. Z.'. The stamp is mostly illegible but seems to contain some text around the perimeter.

REVENDICĂRI:

Metodă de sinteză a nanoparticulelor de aur grefate „in-situ” prin reducerea acidului cloroauric cu poli(4-etinilbenzohidrazidă). Mai exact, amestecul între soluții organice de poli(4-etinilbenzohidrazidă) și soluții apoase de acid cloroauric în concentrații de până la 50 mM sub agitare.

Metodă de bioconjugare a nanoparticulelor de aur grefate cu polihidrazide cu enzime folosind EDC/NHS sau alți agenți de activare compatibili.

A circular stamp, likely an official seal or logo, is located in the bottom right corner of the page. To its right is a handwritten signature in black ink.

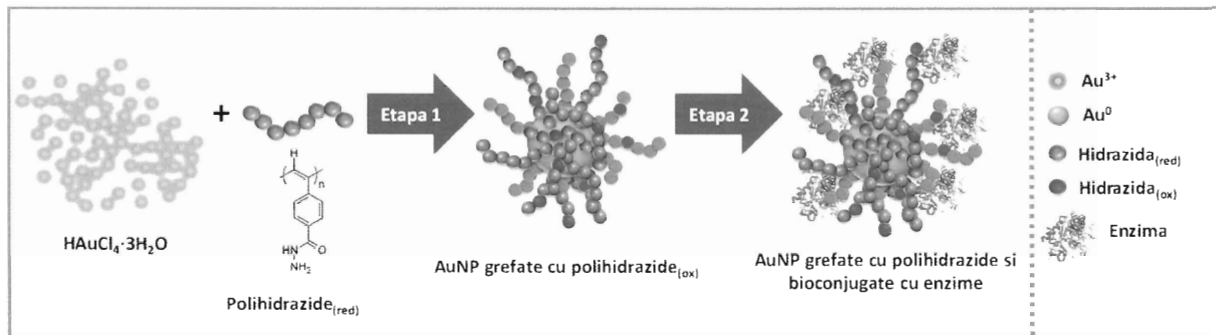


Figura 1. Reprezentare schematică generală a fabricării AuNP grefate cu polihidrazide și bioconjugate cu enzimă:
 Etapa 1-reducerea și coordonarea AuNP prin polihidrazide;
 Etapa 2-bioconjugare cu enzimă

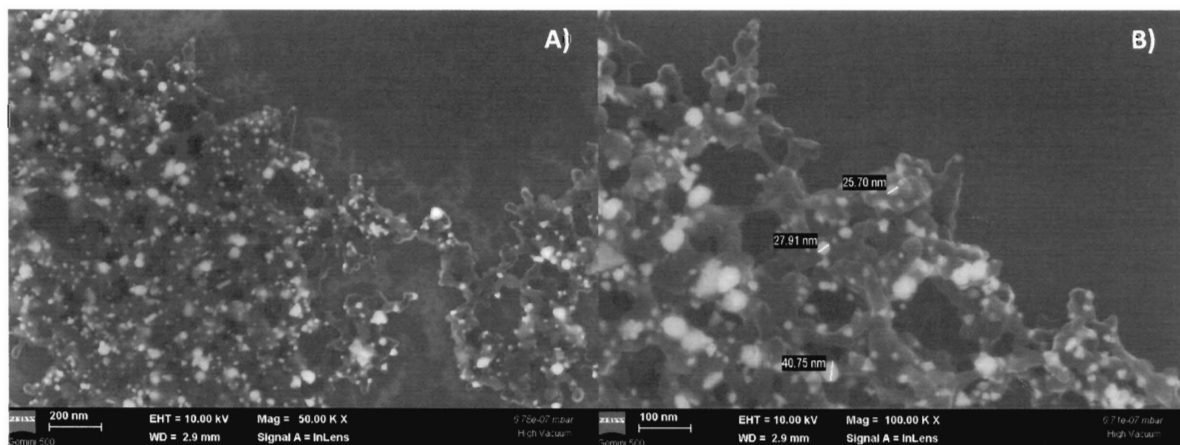


Figura 2. Imagini de spectroscopie electronică de baleiaj la magnificări de: A) 50 kX și B) 100 kX, care atestă formarea de AuNP grefate cu polihidrazide, într-o matrice de polimer



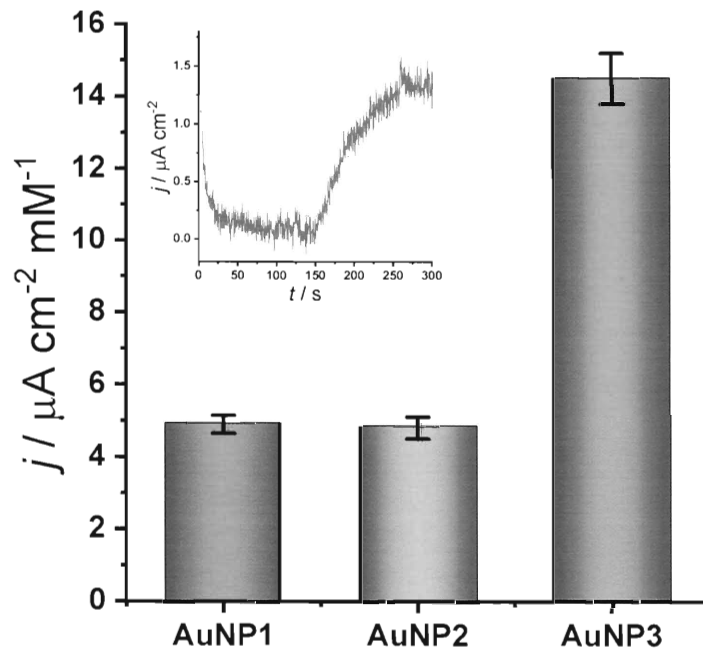


Figura 3. Variația sensibilității unui biosenzor amperometric (obținut utilizând conjugate de AuNP și o enzimă imobilizate pe suprafața unui electrod de Au) cu tipul de AuNP utilizate, unde: AuNP1- AuNP stabilizate în citrat, AuNP2 – AuNP grefate cu polihidrazide în absența EDC/NHS și AuNP3- AuNP grefate cu polihidrazide în prezența EDC/NHS; insertul reprezintă răspunsul cronoamperometric tipic al biosenzorului în prezența substratului enzimatic.