



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 01059**

(22) Data de depozit: **21.12.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.06.2014 BOPI nr. 6/2014

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
MICROTEHNOLOGIE,
STR. EROU IANCU NICOLAE NR. 126A,
BUCUREȘTI, B, RO

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

(54) **PROCEDEU DE BIO-FUNCȚIONALIZARE A UNUI
IMUNOSENZOR PENTRU DETERMINAREA CANTITATIVĂ A
UNUI MARKER CARDIAC**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru determinarea unui marker cardiac, utilizat în domeniul biomedical. Metoda conform invenției constă din curățarea unor electrozi de aur interdigitalizați, care sunt funcționalizați chimic, cu formarea unor monostraturi autoasamblate mixte, pentru grefare grupări carboxil, după care grupările carboxil terminal se activează chimic, formând

un strat molecular pe suprafața de aur, care permite imobilizarea eficientă a anticorpilor monoclonali anti hFABP pe suprafața lor, și determinarea cantitativă a proteinei dintr-o probă biologică de ser uman.

Revendicări: 1
Figuri: 5



Procedeu de bio-funcționalizare a unui imunosenzor pentru determinarea cantitativa a unui marker cardiac

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MARCURI	
Cerere de brevete de invenție	
Nr.	a 2012 01059
Data depozit	21-12-2012

Invenția se referă la un procedeu pentru determinare cantitativă a proteinei de legare a acizilor grași fracția cardiacă (hFABP) din ser uman (proba lichidă) cu ajutorul unui imunosenzor interdigitat cu electrozi de aur. Domeniul de aplicare este cel biomedical și anume laboratoare clinice, cabinet medicale sau camere de urgență.

Se cunoaște, în literatura de specialitate, un imunosenzor amperometric construit prin imobilizarea unui anticorp primar (anticorp de captură) pe o membrană de nitroceluloză sau pe o membrană de nylon activată. Pentru detectia hFABP din probă s-a utilizat proteina hFABP legată de o enzimă, gluco-oxidază (GOD) sau un anticorp secundar anti hFABP legat cu GOD. În ambele cazuri, s-a determinat activitatea enzimatică a GOD, după adăugarea unei cantități de glucoză. Aceasta a permis determinarea cantitativă a hFABP în domeniul de liniaritate 100-300 ng/mL. Este cunoscut un imunosenzor amperometric cu electrozi de carbon. Pentru acesta, s-au utilizat un anticorp primar (anticorp de captură) pentru imobilizare pe suprafața electrozilor și un anticorp secundar marcat cu fosfatază alcalină pentru detectia hFABP din probă. Timpul de detecție al hFABP a fost de 20 min., iar liniaritatea curbei de calibrare a fost cuprinsă între 10 și 350 ng/mL. S-a realizat, de asemenea și un imunosenzor amperometric tot cu electrozi de carbon, având același principiu de detecție. Timpul de detecție al hFABP a fost de 50 min., iar liniaritatea curbei de calibrare a fost cuprinsă între 4 și 250 ng/mL. Dezavantajul acestor imunosenzori constă în faptul că sunt folosiți în metode indirecte, care necesită un număr mare de reactivi, iar sensibilitatea este redusă.

Se mai cunoaște, un imunosenzor cu detecție optică directă a hFABP. Au fost realizați doi traductori cu fibre optice, proteina hFABP fiind cuantificată prin metoda Rezonanță Plasmonică de Suprafață. Dezavantajul utilizării acestui imunosenzor constă în faptul că limita de detecție este foarte mare – 200 nM.

Funcționalizarea bio-chimică a electrozilor de aur este procesul cheie de construcție al imunosenzorului. În funcție de acest proces, suprafața electrozilor este capabilă să rețină exclusiv proteina de interes, hFABP, din probă biologică,

cu atat mai mult cu cat, aceasta proba este un amestec complex de alte proteine, electroliti, medicamente.

Pana in prezent, nu s-au gasit in literatura de specialitate imunosenzori interdigitati cu electrozi de aur functionalizati cu monostraturi autoasamblate mixte pe care sa se imobilizeze anticorpi monoclonali anti hFABP pe suprafata lor cu scopul de a determina cantitativ proteina hFABP din proba biologica, serul uman.

Avantajul utilizarii aurului ca material de realizare a electrozilor interdigitati, consta in faptul ca prezinta o reactivitate scazuta, aproape nula cu mediul de reactie si poate fi preparat selectiv numai pentru proteina de interes cu scopul de a evita reactii incrucisate cu alti analiti din proba biologica.

Problema tehnica pe care o rezolva procedeul de bio-functionalizare conform inventiei consta din aceea că permite determinarea cantitativa, directa, a proteinei hFABP din proba biologica, fara a necesita reactivi suplimentari care sa contina alte proteine (enzime, anticorpi secundari) si cromofori, cu o mare sensibilitate si specificitate.

Procedeul de bio-functionalizare a electrozilor interdigitati de aur conform inventiei, cuprinde urmatoarele etape:

1. curatarea electrozilor si verificarea gradului de curatare prin metoda spectrometriei de impedanta electrochimica (EIS)
2. functionalizarea chimica a electrozilor de aur cu formare de monostraturi autoasamblate mixte, prin intermediul acidului 11 mercaptoundecanoic (11 MUA) si alcoolului 3 mercaptopropanol (3MPOH), cu grupari reactive terminale carboxil si verificarea formarii monostraturilor autoasamblate prin metoda EIS;
3. activarea gruparilor terminale carboxil cu N-hidroxisuccinimida (NHS) si 1-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (EDC) pentru formarea unor NHS esteri;
4. imobilizarea prin legaturi covalente a anticorpului monoclonal anti hFABP cu NHS esterii obtinuti anterior;
5. blocarea gruparilor ramase libere cu albumina bovina serica (BSA) si verificarea bio-functionalizarii electrozilor prin metoda EIS.

Electrozii de aur nativ, policristalin, neactivati chimic sau bio-chimic, sunt suprafete inerte, care practic nu interactioneaza cu compusi chimici sau biochimici.

Prin bio-functionalizarea controlata a electrozilor de aur se obtin suprafete cu mare specificitate in determinarea cantitativa a unor proteine de interes.

Functionalizarea electrozilor de aur interdigitati cu formare de monostraturi autoasamblate mixte conduce la formarea unui strat molecular pe suprafata de aur care permite imobilizarea eficienta a anticorpului de captura.

Avantajele procedului de functionalizare chimice cu monostraturi autoasamblate mixte a electrozilor constau in:

- aceste straturi sunt foarte stabile si nu se denatureaza in timpul determinarilor electrice;
- realizeaza o buna acoperire a suprafetei de aur;
- raportul stabilit intre numarul de molecule cu catena lunga 11 MUA si numarul de molecule cu catena scurta 3MPOH permite o buna imobilizare din punct de vedere al orientarii sterice a anticorpului anti hFABP;
- anticorpul anti hFABP se imobilizeaza prin legaturi covalente, deci prin legaturi puternice si nu exista pericolul desorbției acestuia de pe suprafata in timpul interactiei cu proba.
- bio-electrodul prezinta o inalta specificitate deoarece a fost pregatit in scopul imobilizarii unei singure proteine si anume hFABP;
- utilizarea unui anticorp monoclonal specific reduce semnificativ reactiile incrucisate cu alti analiti;
- avand in vedere ca suportul initial, aurul, este practic inert chimic si biochimic, interactia cu proba se va face exclusiv cu aria activa, bio-functionalizata, "zgomotul de fond" fiind extrem de scazut.

Se da, in continuare, un exemplu de realizare a procedului de bio-functionalizare conform inventiei, in legatura cu figurile 1-5, care reprezinta:

- fig.1, imunosenzor: - regiunea interdigitata (1) cu electrozi de aur (4) sau aria activa; - aria activa (2) conectata prin intermediul unor paduri (de aur) la sistemul de citire AGILENT 4263B RCR care permite masurarea valorilor capacitatii electrozilor dupa interactia cu proba; - aria totala (3) a imunosenzorului, de 7,2 mm²; - electrozi de aur (4) cu o grosime de 10 μm;
- fig.2, schema reactiilor din cadrul procedurii de bio-functionalizare a electrozilor de aur, cu urmatoarele etape : 1- curatare suprafete; 2- formare monostraturi autoasamblate mixte; 3- activarea cu EDC+NHS; 4-

imobilizarea covalenta a anticorpului anti hFABP; 5- blocare situsuri neocupate cu BSA;

- fig. 3, schema circuitului echivalent EIS; unde, R_s – rezistenta solutiei la interfata electrodului de aur, R_{ct} – rezistenta de transfer electronic cand in solutie avem proba redox, C_{dl} – capacitatea dielectrica a stratului format la suprafata electrodului;
- Tabel 1 – Valorile capacitatilor obtinute din fitarea datelor de la impedanta, utilizand programul de fitare auto *RC Fitting* din softul Volta Master 4 dupa etapele de bio-functionalizare;
- fig.4, curba de calibrare – modificarea capacitatii imunosenzorului functie de logaritmul concentratiei de proteina hFABP a celor sase calibratori;
- fig. 5, exemplu de curba de verificare a imunosenzorului cu probe biologice de control, ser uman, cu concentratii de proteina hFABP cunoscute.

Exemplu

Procedeu conform inventiei cuprinde urmatoarele etape:

1. Curatarea suprafetelor electrozilor. Procesul de curatare se realizeaza astfel: se introduc electrozii in metanol p.a. timp de 10 min., apoi in acetona timp de 10 min., apoi intr-o solutie 50% etanol absolut si apa timp de 10 min., apoi in izopropanol timp de 10min., apoi in solutie Pirahna (H_2SO_4 98%: H_2O_2 30% = 3:1 v/v) timp de 10 min., dupa care se spala de 5 ori cu apa deionizata, apoi se spala cu etanol absolut si se usuca la 70°C. Valorile capacitatilor electrozilor dupa curatare, fitate cu programul Voltalab utilizand metoda EIS sunt prezentate in fig.4.

2. Functionalizarea chimica pentru formarea monostraturilor autoasamblate. Se realizeaza prin imersia electrozilor intr-o solutie etanolica 10mM ce contine 11MUA si 3MPOH in raport molar 8:2, timp de 24 ore. In urma acestei functionalizari se grefeaza grupari carboxil reactive pe suprafata electrozilor. Acoperirea electrozilor interdigitati cu monostraturi autoasamblate mixte, se verifica prin metoda EIS, fig.4.

3. Activarea gruparilor carboxil se realizeaza cu un amestec de 20mM NHS si 100 mM EDC, in PBS, timp de 1 ora.

4. Imobilizarea anticorpului de captura. Ca anticorp de captura se utilizeaza un anticorp monoclonal din soarece, anti-uman, clona 9F3. Astfel, aria activa a

electrozilor se incubeaza cu o solutie de 8 μ g/mL anticorp in PBS, timp de 12 ore, la 4°C, apoi se spala cu PBS.

5. Blocarea suprafetelor electrozilor se realizeaza cu o solutie de BSA 1% in PBS timp de 1 ora la temperatura camerei, dupa care se spala cu PBS. Verificarea procedurii de bio-functionalizare se face prin metoda EIS, ca in fig.4.

Imunosenzorii se utilizeaza apoi pentru determinari cantitative ale hFABP din probe.

Etapele realizarii curbei de calibrare sunt:

1. se utilizeaza un set de 6 calibratori de proteina hFABP cu urmatoarele concentratii: $c_0=0$ ng/mL, $c_1=0,098$ ng/mL, $c_2=1,56$ ng/mL, $c_3=6,25$ ng/mL, $c_4=12,5$ ng/mL, $c_5=50$ ng/mL si $c_6=100$ ng/mL;
2. se pune in contact calibratorul cu aria activa a imunosenzorului, aceasta fiind conectata cu ajutorul unor paduri (de aur) la sistemul de citire AGILENT 4263B RCR;
3. se citeste valoarea capacitatii a electrozilor interdigitati de pe suprafata imunosenzorului cu sistemul de citire AGILENT 4263B RCR;
4. dupa ce se citesc valorile tuturor calibratorilor se calculeaza curba de calibrare prin exprimare grafica a capacitatii (nF) pentru fiecare calibrator, inclusiv c_0 (axa y) functie de logarithmul concentratiei fiecarui calibrator (ng/mL) (axa x) utilizand ca soft Microcal Origin 6.0.

Caracteristicile curbei de calibrare sunt prezentate in fig.5.

Verificarea bio-functionalizarii se realizeaza cu probe de control, ser uman, cu concentratii diferite: $c_0=0$ ng/mL, $c_1=0,098$ ng/mL, $c_2=1,56$ ng/mL, $c_3=6,25$ ng/mL, $c_4=12,5$ ng/mL, $c_5=50$ ng/mL si $c_6=100$ ng/mL si implica urmatoarele etape:

1. se pune in contact serul de control cu aria activa a imunosenzorului, aceasta fiind conectata cu ajutorul unor paduri (de aur) la sistemul de citire AGILENT 4263B RCR;
2. se citeste valoarea capacitatii a electrozilor interdigitati de pe suprafata imunosenzorului cu sistemul de citire AGILENT 4263B RCR;

3. dupa ce se citesc valorile tuturor serurilor de control se exprima grafic capacitatea (nF) pentru fiecare ser de control (axa y), functie de logaritmul concentratiei fiecarui ser de control (ng/mL) (axa x) utilizand ca soft Microcal Origin 6.0.

Utilizarea unor seruri umane de control, probe reale cu concentratii cunoscute de hFABP arata faptul ca procedeul asigura un grad ridicat de specificitate, asa cum reiese din figura 6.

Utilizarea unor imunosenzori de unica folosinta conduce la evitarea contaminarii prin folosirea acelorasi senzori la mai multe probe.

Revendicare

1. Procedeu de bio-functionalizare a unui imunosenzor cu electrozi de aur interdigitati, pentru determinarea cantitativa a proteinei de legare a acizilor grasi fractia cardiaca , **caracterizat prin aceea ca** mai intai se curata suprafetele electrozilor prin introducerea succesiva in metanol p.a. timp de 10 min., in acetona timp de 10 min., intr-o solutie 50% etanol absolut si apa, timp de 10 min., in izopropanol, timp de 10 min., in solutie Pirahna , timp de 10min., dupa care se spala de 5 ori cu apa deionizata si cu etanol absolut si se usuca la 70°C, in continuare se functionalizeaza chimic pentru formarea monostraturilor autoasamblate pentru grefare grupari carboxil, cu o solutie etanolica 10mM ce contine acid 11mercaptoundecanoic si 3mercaptopropanol in raport molar 8:2, timp de 24 ore, se activeaza gruparile carboxil cu transformare in sulfo N-hidroxisuccinimid esteri prin imersare intr-un amestec de N-hidroxisuccinimida 20mM si 1-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida 100 mM, in tampon fosfat salin, timp de 1 ora, se imobilizeaza anticorpul de captura, un anticorp monoclonal din soarece, anti-uman, clona 9F3, aria activa a electrozilor incubandu-se cu o solutie de anticorp 8µg/mL, in tampon fosfat salin, timp de 12 ore, la 4°C, dupa care se spala cu tampon fosfat salin, se blocheaza cu o solutie de albumina bovina serica 1%, in tampon fosfat salin, timp de 1 ora, la temperatura camerei, apoi se spala din nou cu fosfat tampon salin, si se mai verifica bio-functionalizarea prin metoda spectrometriei de impedanta electrochimica.

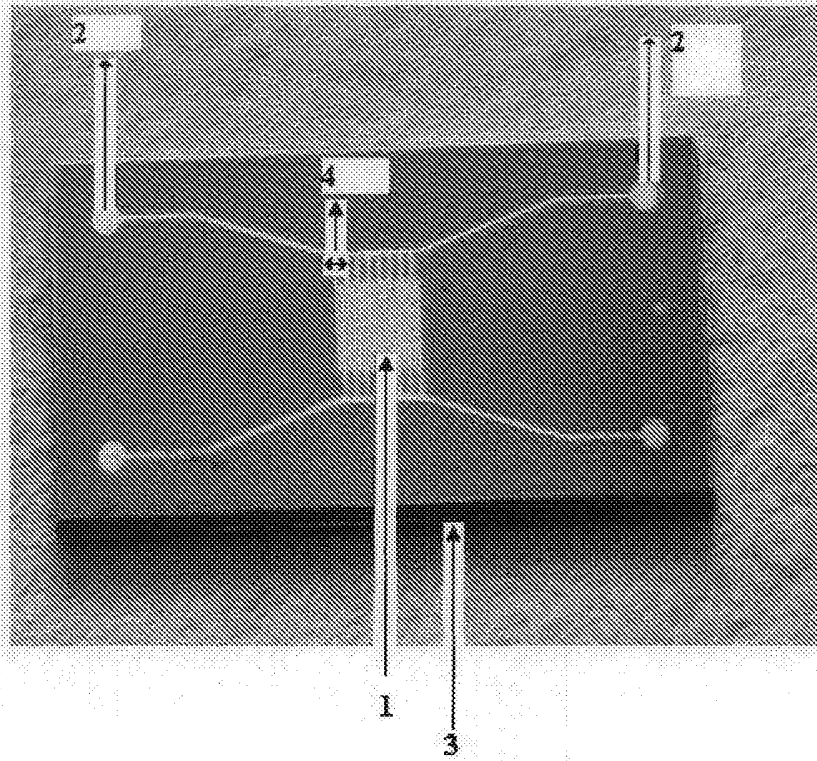


Fig.1

Electrod de Au cu impuritati

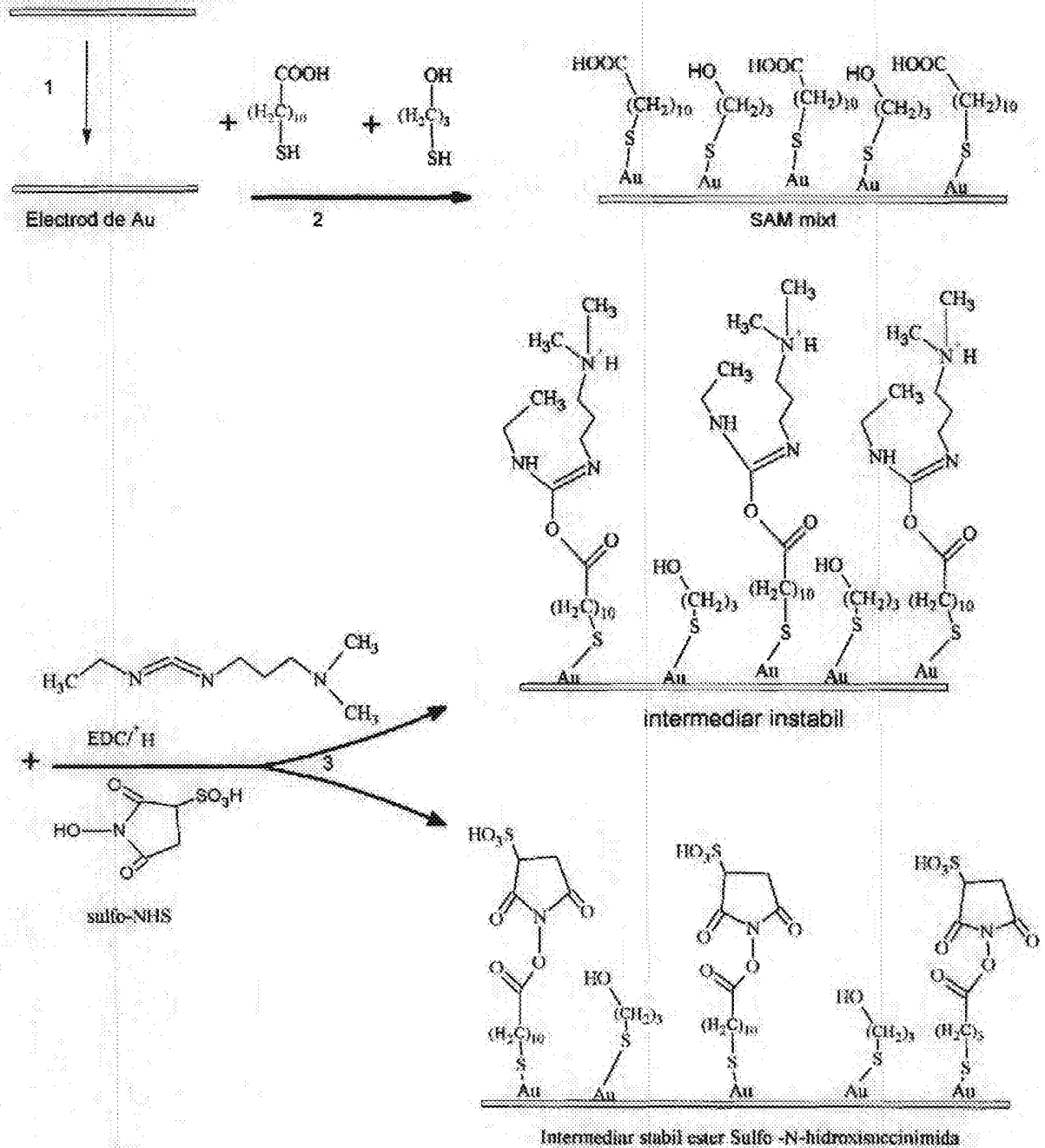


Fig.2 (se continua si pe pagina urmatoare)

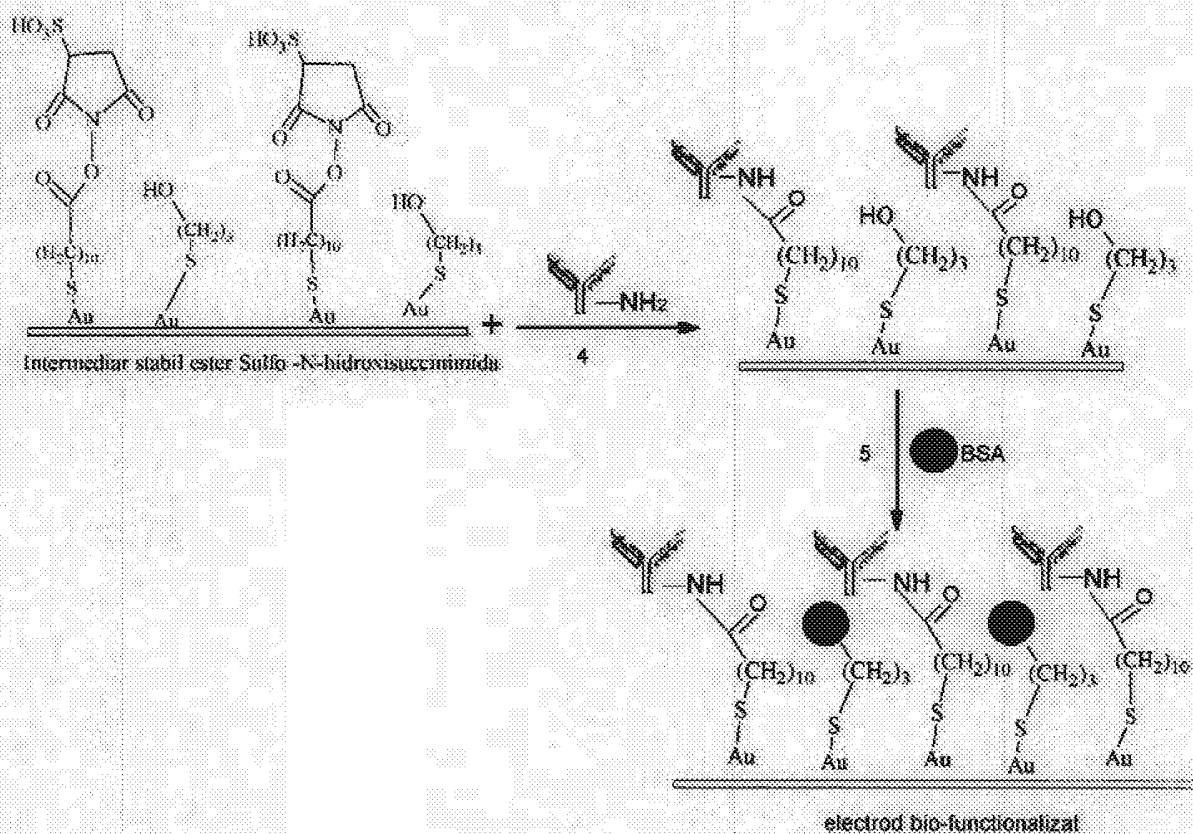


Fig.2

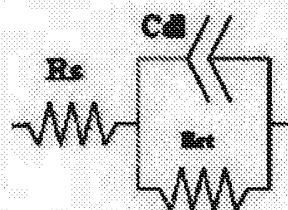


Fig.3

21-12-2012

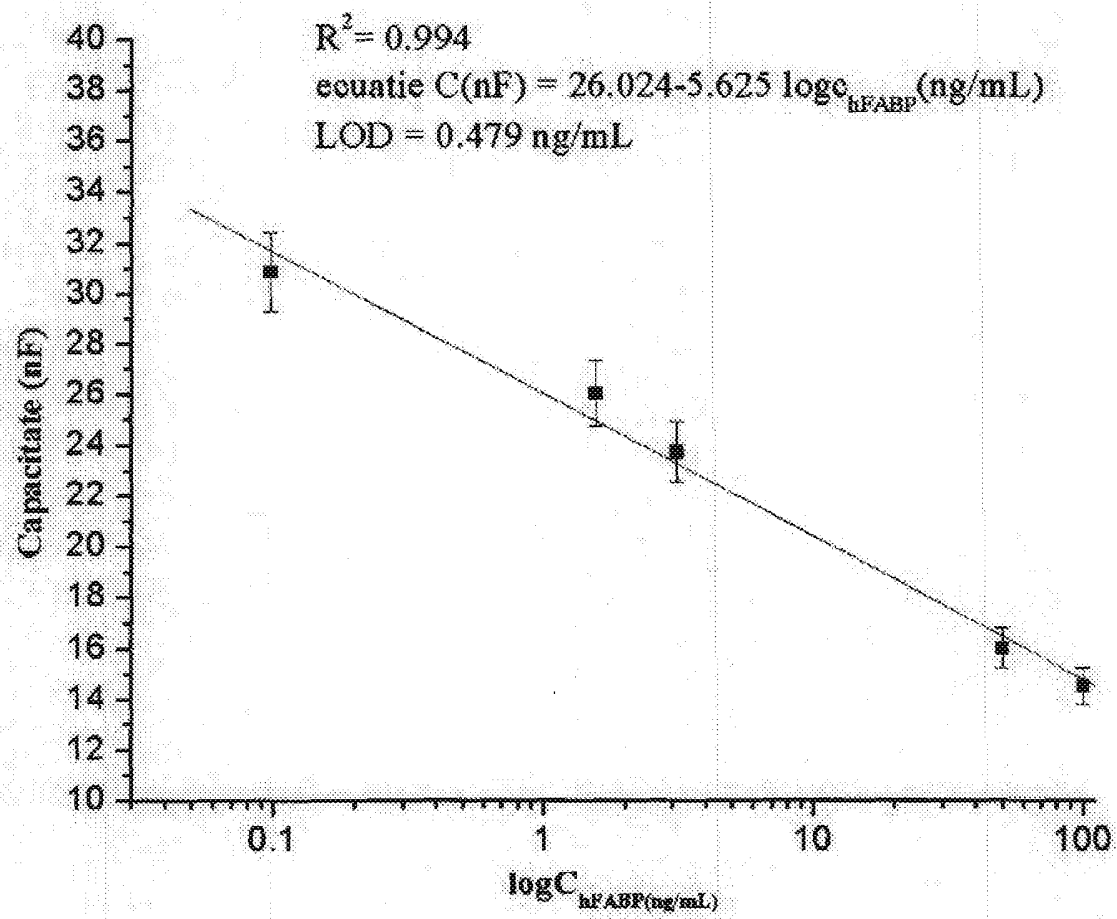


Fig.4

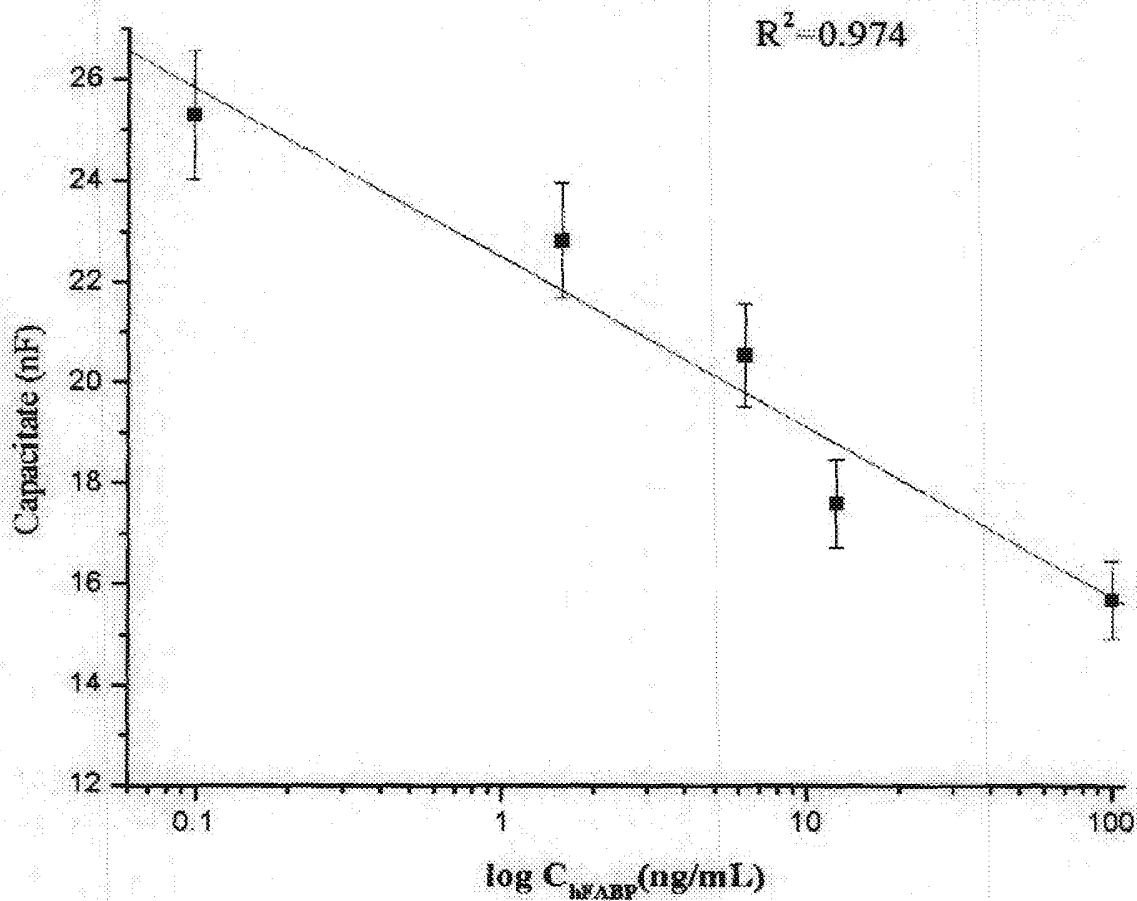


Fig. 5

Tabel 1.

Etape de bio-funcționalizare	C ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	R^2 (coeficient de fitare)
1. Curățare suprafețe electrozi	11.95	0.996
2. Formare straturi autoasamblate	2.15	0.997
3. Activarea cu EDC+NHS	Nu este cazul	Nu este cazul
4. Imobilizare anticorp anti-hFABP	1.54	0.989