



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

B82Y 5/00 (2020.08); C07H 21/02 (2020.08); G01N 27/49 (2020.08); B05D 1/18 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2019145365, 31.12.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
31.12.2019

Дата регистрации:
25.03.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 31.12.2019

(45) Опубликовано: 25.03.2021 Бюл. № 9

Адрес для переписки:

105005, Москва, ул. Бауманская 2-я, 5, стр. 1,
ООО "МИЦ МГТУ ИМ. Н.Э. БАУМАНА",
Комарову И.А.

(72) Автор(ы):

Нелюб Владимир Александрович (RU),
Орлов Максим Андреевич (RU),
Калинников Александр Николаевич (RU),
Бородулин Алексей Сергеевич (RU),
Комаров Иван Александрович (RU),
Антипова Ольга Михайловна (RU),
Стручков Николай Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московский государственный
технический университет имени Н.Э.
Баумана (национальный исследовательский
университет)" (МГТУ им. Н.Э. Баумана) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 9494582 B2, 15.11.2016. US 9127304
B2, 08.09.2015. US 20140363808 A1, 11.12.2014.
RU 2527699 C1, 10.09.2014. Dolinnaya Nina G.
et al, Nucleosides & Nucleotides, 1994, 13(10),
2169-2183. Naoki Nakajima et al, Bioconjugate
Chem., 1995, 6, 123-130. David Mitchell, III et al,
RNA, 2019, 25(1), стр. 147-157. Ткачев С.В.,
"Восстановленный оксид (см. прод.)

(54) Способ иммобилизации коротких нуклеотидных последовательностей на поверхность и торцевые области наноматериалов

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу иммобилизации коротких нуклеотидных последовательностей аминомодифицированных ДНК или РНК олигонуклеотидов на поверхность и торцевые области наноматериалов и может быть использовано в промышленности при производстве биоконструкций. Предложен способ иммобилизации коротких нуклеотидных последовательностей аминомодифицированных ДНК или РНК олигонуклеотидов на поверхность и торцевые области наноматериалов, имеющих в своем составе кислородсодержащие

функциональные группы, включающий подготовку раствора олигонуклеотидов концентрации не ниже 50 мкМ в буферном растворе с рН в диапазоне 4-6,9, смешивания указанного раствора с раствором 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимидом с концентрацией не ниже 5 мМ, в буфере на основе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) и этанола и нанесения финального раствора на подложку в чувствительную область формируемого биосенсора с последующим выдерживанием раствора не менее 12 часов на

подложке с целью максимального полного протекания реакции связывания ДНК или РНК олигонуклеотидов с углеродным наноматериалом, имеющим в своем составе кислородсодержащие функциональные группы.

Предложен новый эффективный способ, позволяющий формировать биологические сенсоры на основе углеродных наноматериалов. 5 з.п. ф-лы, 2 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

графена: получение, строение, свойства", автореферат на соискание ученой степени кандидата химических наук, Москва 2012.

R U 2 7 4 5 5 1 1 C 1

R U 2 7 4 5 5 1 1 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

B82Y 5/00 (2011.01)**C07H 21/02** (2006.01)**G01N 27/49** (2006.01)**B05D 1/18** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

B82Y 5/00 (2020.08); **C07H 21/02** (2020.08); **G01N 27/49** (2020.08); **B05D 1/18** (2020.08)(21)(22) Application: **2019145365**, **31.12.2019**(24) Effective date for property rights:
31.12.2019Registration date:
25.03.2021

Priority:

(22) Date of filing: **31.12.2019**(45) Date of publication: **25.03.2021** Bull. № 9

Mail address:

**105005, Moskva, ul. Baumanskaya 2-ya, 5, str. 1,
OOO "MITS MGTU IM. N.E. BAUMANA",
Komarov I.A.**

(72) Inventor(s):

**Nelyub Vladimir Aleksandrovich (RU),
Orlov Maksim Andreevich (RU),
Kalinnikov Aleksandr Nikolaevich (RU),
Borodulin Aleksej Sergeevich (RU),
Komarov Ivan Aleksandrovich (RU),
Antipova Olga Mikhajlovna (RU),
Struchkov Nikolaj Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Moskovskij gosudarstvennyj
tekhnicheskij universitet imeni N.E. Baumana
(natsionalnyj issledovatel'skij universitet)"
(MGTU im. N.E. Baumana) (RU)**(54) **METHOD FOR IMMOBILIZING SHORT NUCLEOTIDE SEQUENCES ON THE SURFACE AND END REGIONS OF NANOMATERIALS**

(57) Abstract:

FIELD: biology.

SUBSTANCE: invention relates to a method for immobilizing short nucleotide sequences of aminomodified DNA or RNA oligonucleotides on the surface and end regions of nanomaterials and can be used in industry in the production of biocomposites. Disclosed is a method for immobilizing short nucleotide sequences of aminomodified DNA or RNA oligonucleotides on the surface and end regions of nanomaterials containing oxygen-containing functional groups, including preparing a solution of oligonucleotides with a concentration of at least 50 mM in a buffer solution with a pH in the range of 4-6.9, mixing the specified solution with a solution of 1-

ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide with a concentration of at least 5 mM, in a buffer based on 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and ethanol and applying the final solution to a substrate in the sensitive area of the formed biosensor followed by keeping the solution for at least 12 hours on the substrate in order to maximize the complete reaction of binding DNA or RNA oligonucleotides with carbon nanomaterial containing oxygen-containing functional groups.

EFFECT: disclosed is a new effective method that makes it possible to form biological sensors based on carbon nanomaterials.

6 cl, 2 dwg, 1 ex

Изобретение относится к способам модификации наноструктур путем ковалентного связывания коротких нуклеотидных ДНК или РНК последовательностей с функциональными группами на поверхности или торцевых областях наноструктур с целью формирования функциональных биокompозитных структур.

Известны способы связывания низкоразмерных биологических структур с наноматериалами, в частности с углеродными нанотрубками и графеноподобными материалами с целью формирования чувствительной области биосенсоров. При этом модификация может производиться как ковалентно, так и через другие типы связей (водородная связь, ван-дер-ваальсово взаимодействие). Также следует отметить широкую номенклатуру иммобилизуемых биологических структур и разнообразие конкретных техник исполнения процедуры иммобилизации и формирования биочувствительного слоя в целом.

В патенте [US 9127304 B2] описан метод формирования биосенсоров на основе проводящих полимеров, где раствор мономерных звеньев проводящего полимера перед нанесением на подложку легируется отрицательно заряженными наночастицами. После нанесения происходит электрополимеризация мономерных звеньев на поверхности электрода-подложки. В качестве связываемых мономерами биочувствительных агентов применяются ДНК в виде дендримеров, ДНК/РНК в виде спиралей и белки. В качестве проводящего полимера может быть использован полиацетилен, полипиррол, политиофен, полианилин, поли-*p*-фениленсульфид и полипарафениленвинил.

В данном патенте способ связывания биочувствительных агентов с проводящим полимером состоит из следующих операций. Мономерные звенья проводящего полимера, связанные с наночастицами наносятся на поверхность рабочего электрода сенсора (электроды сенсора выполнены в виде спиралей)

Основным недостатком данного изобретения является сложность обеспечения повторяемости электрофизических параметров сенсоров в большой их партии, т.к. распределение компонентов в данном случае является случайным и контролируется только изменением концентрации компонентов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу изготовления биосенсора на основе полимера, включающему стадии (а) легирования раствора мономерных звеньев проводящего полимера отрицательно заряженными наночастицами, включающими захватывающий фрагмент; и (b) полимеризацию мономерных звеньев на поверхности датчика, содержащего электрод, тем самым захватывая наночастицы на поверхности SSO.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию (с) контактирования полимеризованной поверхности с представляющим интерес биологическим полимером, конъюгированным с целевым фрагментом, где целевой фрагмент имеет сродство к указанному захватывающему фрагменту. В одном варианте датчик содержит золото. В одном варианте осуществления проводящий полимер выбран из группы, состоящей из поли (ацетилена), поли (пиррола), поли (тиофена), поли (анилина), поли (p-фениленсульфида) и поли (парафенилен винил). В одном варианте проводящий полимер представляет собой полипиррол. В одном варианте мономерными звеньями является пиррол. В одном варианте осуществления пиррол присутствует в концентрации от около 1 до около 100 мМ. В одном варианте осуществления пиррол присутствует в концентрации от около 5 до около 20 мМ. В одном варианте осуществления заряженная наночастица содержит отрицательно заряженный дендример. В одном варианте осуществления дендример представляет собой ДНК-дендример. В одном варианте осуществления заряженная наночастица присутствует в концентрации

от примерно 0,1% (об. / Об.) До примерно 1,0% (об. / Об.). В одном варианте осуществления поверхностная плотность наночастиц на поверхности датчика составляет от около 0,20 пмоль / см до около 2,0 пмоль / см. В одном варианте осуществления захватывающий фрагмент представляет собой антитело или его функциональный фрагмент, авидин, стрептавидин, аптамер, шпигельмер, глутатион или S-пептид. В одном варианте осуществления захватывающий фрагмент представляет собой антитело против биотина или стрептавидина. В одном варианте осуществления полимеризация достигается путем электрополимеризации или фотополимеризации. В одном варианте осуществления электрическое поле циклической прямоугольной формы используется для электрополимеризации. В одном варианте осуществления биологический полимер, представляющий интерес, представляет собой белок. В одном варианте осуществления биологический полимер, представляющий интерес, представляет собой нуклеиновую кислоту. В одном варианте осуществления целевой группой является биотин. В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает биосенсор на основе полимера, изготовленный способом по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления проводящий полимер биосенсора на основе полимера представляет собой полипиррол, а наночастицы представляют собой ДНК-дендримеры.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к способу обнаружения аналита в растворе, включающему стадии (а) контактирования раствора с биосенсором на основе полимера; (б) приложение напряжения к электроду; и (с) определение тока, генерируемого на биосинтезе.

В одном варианте осуществления аналит представляет собой белок. В одном варианте осуществления белок присутствует в концентрации от примерно 100 фг / мл до примерно 2,5 г / мл. В одном варианте осуществления аналит представляет собой нуклеиновую кислоту. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота присутствует в концентрации от примерно 10 до примерно 10 мкМ. В одном варианте осуществления раствор содержит жидкость организма. В одном варианте осуществления жидкость организма представляет собой слюну. В одном варианте осуществления аналит представляет собой биомаркер рака полости рта. В одном варианте осуществления аналит выбран из группы, состоящей из белка IL-8, белка IL-1В и мРНК IL-8.

Наиболее близким к предлагаемому способу является способ, описанный в патенте США [US 9494582 B2]. А именно в патенте описан способ создания сенсора на поверхностных акустических волнах, где в качестве биочувствительного слоя используются аптамеры, имеющие на концах аминокислотную группу, и специфически связывающиеся с биомолекулой-мишенью. Кроме того, чувствительный слой может включать SAM-линкер между подложкой и аминным фрагментом или 3-меркаптопропионовую кислоту (МПА). Также метод создания чувствительной области может включать удаление неспецифически иммобилизованных аптамеров.

Протокол иммобилизации включает в себя использование одного из таких химических реагентов как N-Гидроксисукцинимид (NHS) и 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC) или их смеси для иммобилизации аптамеров через аминомодифицированный конец. А именно, последовательность процесса иммобилизации аптамеров следующая: подложки с золотой пленкой погружали в 10 мМ раствор 3-меркаптопропионовой кислоты (МПА) на 30 минут и затем промывали этанолом и деионизированной водой. После сушки предметных стекол их погружали в раствор N-гидроксисукцинимид (NHS) и N- (3-диметиламинопропил) -N-этилкарбодиимида гидрохлорида (EDC) с концентрациями растворов 0,2 М, и 0,05 М соответственно на 30 минут. Затем подложки с золотой пленкой промывали

деионизированной водой и затем погружали в 5 мкМ раствор аптамера. Наконец, предметные стекла промывали фосфатным буфером (PBS), чтобы смыть неспецифически адсорбированные белки.

В патенте [3 US20140363808A1] описан метод скрининга аптамеров на основе графена без иммобилизации мишени и аптамеров, полученных этим способом, и, в частности, новый метод GO-SELEX без иммобилизации мишени, в котором один пул нуклеиновой кислоты с цепями может реагировать с несвязанным целевым материалом или материал-мишень, после которого одноцепочечная нуклеиновая кислота, которая не была связана с мишенью или контр-мишенью, может быть отделена с использованием графена.

Кроме того, конкретный аптамер, полученный описанным выше способом, можно использовать для диагностики заболеваний, связанных с мишенью.

Раскрытие изобретения

Технической задачей предлагаемого изобретения является формирование чувствительной биологического сенсора за счет иммобилизации чувствительных к биомолекулам ДНК/РНК олигонуклеотидов, вследствие чего формируется трансдьюсер чувствительная область биологического сенсора, выступающая одновременно трансдьюсером. Иммобилизация происходит на кислородсодержащие группы, присутствующие в углеродных нанотрубках в том числе торцевые функциональные группы или слабо восстановленном оксиде графена, содержащего функциональные группы на гранях решетки. При этом сам процесс иммобилизации не изменяется, вне зависимости от используемого материала.

В предлагаемом патенте ДНК или РНК олигонуклеотиды наносятся непосредственно на слой углеродных нанотрубок или восстановленного оксида графена, содержащий кислородсодержащие функциональные группы, что обеспечивает в дальнейшем улучшенные характеристик всего биосенсора, в частности позволяет обеспечить минимальное соотношение сигнал/шум и максимальную чувствительность сенсора за счет того, что минимизируется расстояние транспорта заряда между биочувствительной и проводящим сигнал слоем.

Для обеспечения иммобилизации требуется использовать дополнительные реагенты, а именно 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC). При этом EDC, являющийся в данном случае основным реагентом который и используется для активации карбоксильных групп, содержащихся на поверхности слабо восстановленного оксида графена для последующего связывания аминомодифицированной ДНК или РНК. При этом в отличие от вышеуказанных источников уровня техники применяется одностадийный процесс иммобилизации, включающий процесс иммобилизации аптамеров на слабо восстановленный оксид графена с помощью раствора EDC в дистиллированной воде с добавлением 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), что обеспечивает повышенную смачиваемость пленки углеродных наноматериалов и этанола. Также способ подходит для любого аминомодифицированного аптамера, вне зависимости от конкретной нуклеотидной последовательности.

Общая последовательность операций следующая:

1) Извлечение заготовки биосенсорной структуры с пленкой наноматериала, имеющего в своем составе кислородсодержащие функциональные группы, из транспортного контейнера;

2) Помещение заготовок сенсоров в камеру с инертной атмосферой при комнатной температуре;

3) Формирование раствора EDC с буфером и требуемым количеством аптамеров

(концентрация EDC должна быть не ниже 5мМ, концентрация аминомодифицированной ДНК или РНК - не ниже 50 мкМ). При этом для оптимизации процесса нанесения используется 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES) в концентрации 100 мМ, при рН раствора в диапазоне 4 – 6,9 и добавление 25 масс.% этанола.

5 4) Нанесение 5 мкл капли сформированного на шаге 3 раствора на область заготовки биосенсора, которая впоследствии используется в качестве чувствительной;

5) Выдерживание раствора аптамеров на подложке в течение не менее 12 часов в инертной атмосфере.

6) Удаление остатков раствора аминомодифицированной ДНК или РНК буферным
10 раствором или водой

7) Контроль степени иммобилизации различными методами (Фурье-ИК и т.д.) на специально отобранных структурах.

8) Упаковка готовых структур в транспортные контейнеры.

В качестве подложки-носителя может выступать как твердотельная (кремний, сапфир,
15 кварц и т.д.), так и полимерная подложки (полиэтиленнафталат, полиэтилентерефталат, полидиметилсилоксан и т.д.).

Краткое описание чертежей

Фигура 1. Рамановские спектры на восстановленной поверхности оксида графена до и после иммобилизации аптамеров.

20 Фигура 2. ИК-Фурье спектры биосенсора в области восстановленного оксида с нанесенным аптамером и без такового.

Пример исполнения

Для иммобилизации аптамеров использовалась П-образная пленка восстановленного оксида графена, нанесенная на ПЭТ подложку толщиной 175 мкм. Восстановление
25 оксида графена проводилось локально при минимальных параметрах воздействия когерентным излучением оптического диапазона (442 нм). Спектры комбинационного рассеяния до и после иммобилизации аптамеров приведены на фиг 1. Для иммобилизации использовался аминомодифицированный тромбиновый аптамер с нуклеотидной последовательностью AmTBA (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') в растворе EDC (5 мМ) с
30 добавлением 100 мМ MES буфера и 25 масс. % этанола. Аптамер-содержащая, она же чувствительная область сенсора была обработана раствором аптамеров с концентрацией 50 мкМ и оставлена на 24 часа в атмосфере аргона для наиболее полного протекания реакции иммобилизации. Были получены Фурье-ИК спектры структур с иммобилизованным аптамером и без такового. В структурах, куда не был иммобилизован
35 аптамер, достаточно отчетливо наблюдается колебательный пик от карбоксильных групп (фиг. 2).

Источники информации

1. Патент США US 9127304 B2.
2. Патент США US 9494582 B2.
- 40 3. Патент США US20140363808A1.

(57) Формула изобретения

1. Способ иммобилизации коротких нуклеотидных последовательностей аминомодифицированных ДНК или РНК олигонуклеотидов на поверхность и торцевые
45 области наноматериалов, имеющих в своем составе кислородсодержащие функциональные группы, включающий подготовку раствора олигонуклеотидов концентрации не ниже 50 мкМ в буферном растворе с рН в диапазоне 4-6,9, смешивания указанного раствора с раствором 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида с

концентрацией не ниже 5 мМ, в буфере на основе 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES) и этанола и нанесения финального раствора на подложку в чувствительную область формируемого биосенсора с последующим выдерживанием раствора не менее 12 часов на подложке с целью максимального полного протекания реакции связывания ДНК или РНК олигонуклеотидов с углеродным наноматериалом, имеющим в своем составе кислородсодержащие функциональные группы.

2. Способ иммобилизации по п. 1, отличающийся тем, что при проведении иммобилизации заготовки помещаются в инертную атмосферу.

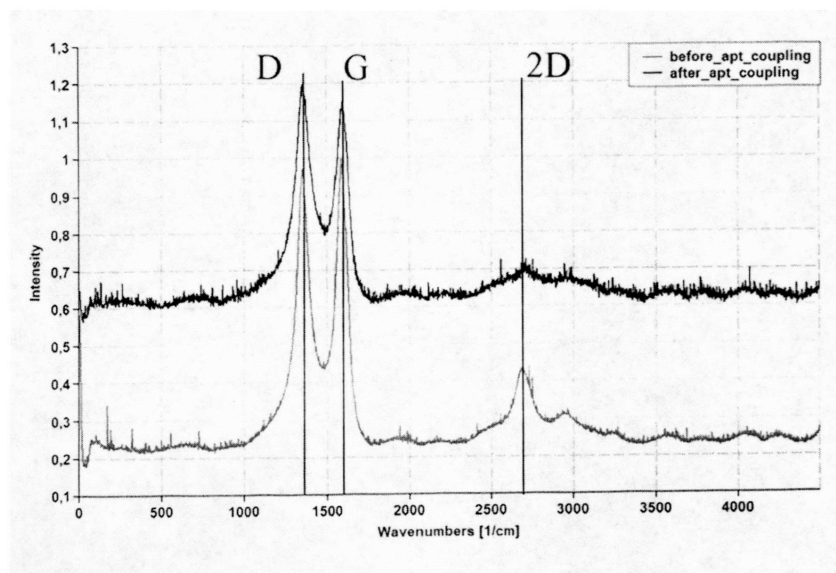
3. Способ иммобилизации по п. 1, отличающийся тем, что в качестве носителя нуклеотидных последовательностей используются функционализированные углеродные нанотрубки, содержащие в том числе торцевые функциональные группы.

4. Способ по иммобилизации по п. 1, отличающийся тем, что в качестве носителя нуклеотидных последовательностей используется пленка слабо восстановленного оксида графена, содержащего функциональные группы на гранях решетки.

5. Способ иммобилизации по п. 1, отличающийся тем, что используется MES буфер, что обеспечивает повышенную смачиваемость пленки углеродных наноматериалов.

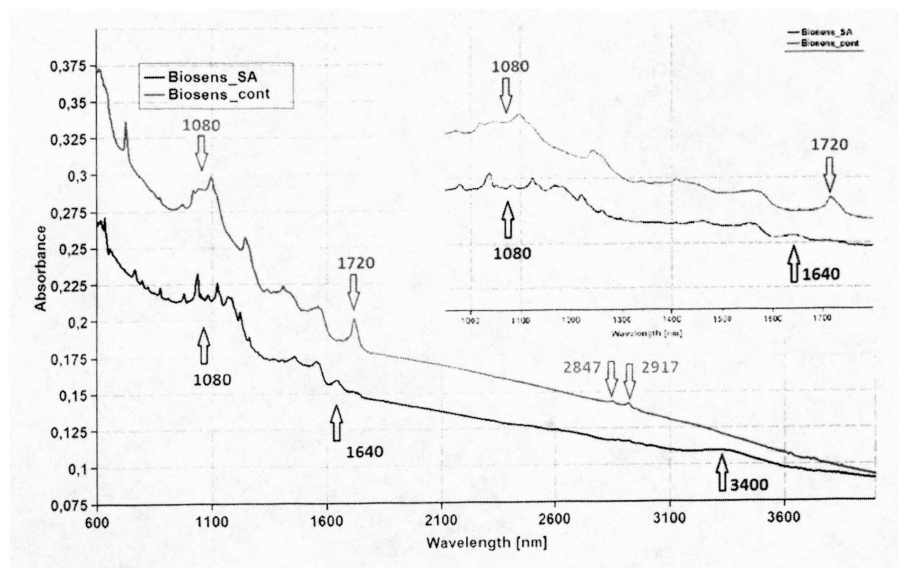
6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для приготовления раствора используют 25 мас. % этанола.

1



Фиг. 1

2



Фиг. 2