



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020024075-7 A2



(22) Data do Depósito: 25/11/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 07/06/2022

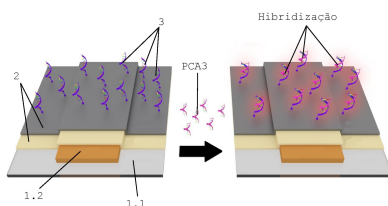
(54) Título: BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR PCA3

(51) Int. Cl.: C12Q 1/6825; C12Q 1/6834; G01N 27/327; G01N 33/574; B82Y 5/00.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP; FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS.

(72) Inventor(es): OSVALDO NOVAIS DE OLIVEIRA JUNIOR; ALEXANDRE CESAR SANTOS; ANDRÉ LOPES CARVALHO; ANDREY COATRINI SOARES; ELINEY FERREIRA LIMA; JULIANA COATRINI SOARES; MATIAS ELISEO MELENDEZ; RUI MANUEL VIEIRA REIS; VALQUIRIA DA CRUZ RODRIGUES.

(57) Resumo: BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR PCA3. A presente invenção refere-se a um biossensor para detecção do biomarcador PCA3 em qualquer amostra biológica para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento do câncer de próstata. O dispositivo da presente invenção é produzido a partir dos eletrodos descartáveis e de baixo custo que detectam o PCA3 a partir de técnicas eletroquímicas, elétricas ou colorimétricas. O biossensor é compreendido preferencialmente por um eletrodo de ouro recoberto por uma matriz de quitosana e nanotubos de carbono que são ligados a uma sonda específica de DNA para hibridização com o PCA3, conferindo ao biossensor alta sensibilidade e seletividade.



BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR PCA3**Campo da invenção:**

[1] A presente invenção se insere no campo das nanotecnologias, mais precisamente em um biossensor eletroquímico e/ou elétrico para detecção do câncer de próstata através da identificação do biomarcador PCA3.

Fundamentos da invenção:

[2] Atualmente, há uma demanda significativa por novos sensores com maior sensibilidade e rapidez nos resultados de diagnósticos, principalmente com vistas à detecção precoce de doenças, como por exemplo o diagnóstico precoce de câncer. Um dos desafios para o diagnóstico desses tipos de neoplasias é a detecção rápida e simultânea de vários analitos a partir de amostras clínicas, por meio de diferentes técnicas. Das tecnologias disponíveis atualmente, os biossensores parecem ser os mais promissores por permitirem a detecção rápida de uma ou mais moléculas de interesse.

[3] O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lions em 1962 [George, et al., Surface and Coatings Technology, 132, 45, 2000.] e compreendia um simples eletrodo enzimático que utilizava a glicose oxidase imobilizada em uma membrana de acrilamida sobre eletrodos de Pt e detectava o consumo de oxigênio sob altos potenciais de redução. Com esse dispositivo, pode-se quantificar a variação da concentração de oxigênio dissolvido que, por sua vez, é proporcional à concentração de glicose. Desde então, diversos tipos de biossensores têm sido preparados para análises clínicas, com resultados rápidos e precisos [J.C. Soares et al., ACS Appl. Mater. Interfaces, 22, 11833, 2015; J.C. Soares et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 18, 8412, 2016].

[4] Um biossensor tem como principal característica a capacidade de combinar a atividade seletiva de um elemento de reconhecimento biológico, sensível a um analito de interesse, com a de um transdutor, que converte um sinal biológico em elétrico, óptico ou de outra grandeza física. Com o biossensor também é possível verificar diferenças de concentração do analito através das alterações nas propriedades elétricas, como corrente e capacitância, na massa depositada sobre o dispositivo, absorção, emissão de luz ou estado de oxidação das moléculas que compõem o dispositivo.

[5] O princípio básico de funcionamento de um biossensor está na detecção de alterações na condutividade, capacitância ou impedância na superfície de um eletrodo, as quais podem ser monitoradas por meio de um transdutor. O transdutor pode ser um dispositivo elétrico que permite verificar através de um sinal as alterações induzidas no processo de detecção de um analito. A resposta elétrica do transdutor pode ainda ser amplificada, armazenada e, então, exibida para o usuário do biossensor.

[6] O câncer de próstata é um dos mais comuns e fatais, no Brasil é o tipo de câncer com a segunda maior taxa de mortalidade entre os homens. Todavia, a chance de cura e o tempo de sobrevida podem ser aumentados consideravelmente com o diagnóstico precoce.

[7] Atualmente, o monitoramento das doenças da próstata é realizado principalmente pela determinação da concentração de antígeno específico da próstata (PSA) no sangue, porém, o PSA não é altamente específico para o câncer de próstata. De fato, os testes séricos de PSA são muito

sensíveis, mas carecem de especificidade para o câncer de próstata, pois altas concentrações de PSA podem ser observadas em outras patologias da próstata. Além disso, em alguns casos, tumores podem se desenvolver antes que a concentração de PSA aumente no organismo. Portanto, com o referido biomarcador, o diagnóstico precoce requer necessariamente a biópsia de amostra da próstata, que só é positiva para câncer em 1 a cada 6 casos de níveis alterados de PSA. Assim, muitos pacientes são desnecessariamente submetidos a este procedimento que é doloroso, expõe o indivíduo a possíveis complicações relacionadas ao mesmo e é de alto custo para o sistema de saúde. A consequência mais relevante, do ponto de vista econômico-social, é que os custos para o sistema de saúde aumentam, além de diminuir a aderência de pacientes aos testes de triagem e consequente tratamento. Em vista disto, muitos esforços têm sido feitos para produzir dispositivos para detecção precoce do câncer de próstata.

[8] Uma alternativa ao uso do PSA é o biomarcador PCA3 para diagnóstico do câncer de próstata, o PCA3 é um RNA específico da próstata sobre-expresso quando há câncer de próstata, sendo um RNA não codificador (lncRNA) de longa duração. A sequência do mesmo tem 3922 nucleotídeos, sem qualquer correlação com outras doenças prostáticas. Neves e colaboradores [A. F Neves, et al., Clin. Chem. Lab. Med., 51, 2013] detectaram PCA3 utilizando PCR no sangue periférico e tecidos prostáticos de pacientes, e encontraram especificidade de 94% e sensibilidade de 32% para as amostras de sangue, com alta correlação com níveis de PSA acima de 10 ng/mL.

[9] Vilela *et al.* construíram um biossensor óptico para detectar PCA3 baseado em nanopartículas de NaYF₄: Yb, Er utilizados como emissores ligados a 25-meros ssDNAs, sondas de captura, e óxido de grafeno (GO), supressor de fluorescência. Os referidos componentes retiveram seu sinal de fluorescência na presença do PCA3 alvo, pois não interagiram com o GO devido à captura do alvo [P. Vilela *et al.*, ACS Sens. 2, 56, 288 2017].

[10] Em outros trabalhos os mRNAs associados ao PCA3 foram detectados usando amplificação medida por transcrição (TMA) por meio da captura das moléculas da urina em partículas magnéticas revestidas com oligonucleotídeos específicos. A emissão de nanopartículas adsorvidas em óxido de grafeno foi usada para detectar PCA3 em concentrações na faixa de fentomolar [P. Kanyong *et al.*, J. Cancer 7, 523, 2016].

[11] Como pode ser visto, não há metodologia bem estabelecida, simples e de baixo custo para detectar o PCA3; sendo assim, esta é a principal razão pela qual os testes com o PCA3 ainda não estão disponíveis para o público em geral, ou pelo menos não nos serviços públicos dos países em desenvolvimento.

[12] Desta forma, a presente invenção compreende um biossensor para detectar o biomarcador PCA3 com alta sensibilidade e seletividade, no qual se utiliza uma sonda de DNA como modelo para a hibridação com uma cadeia de lncRNA do PCA3, em que a imobilização da sonda de DNA é auxiliada pela construção de uma matriz adequada com a técnica de camada por camada.

[13] A referida matriz compreende quitosana e nanotubos

de carbono que servem para manter a atividade das biomoléculas. Ademais, os nanotubos também contribuem significativamente para a transmissão do sinal elétrico e eletroquímico, aumentando a sensibilidade do biossensor.

[14] A quitosana é um material natural proveniente de exoesqueletos de organismos marinhos que a torna um material biocompatível e biodegradável. Já os nanotubos de carbono, possuem uma estrutura mecânica rígida, resistente e resiliente, passíveis de se tornarem solúveis em água para funcionalização de superfícies, o que auxilia sua interação com sistemas fisiológicos. Dessa forma, a integração entre a quitosana e os nanotubos de carbono confere ao biossensor descrito pela presente invenção um excelente meio para preservação da atividade de biomoléculas da camada ativa, como a sonda de DNA de PCA3. Ainda, como a quitosana é um material isolante, sua associação com os nanotubos de carbono gera biossensores com melhores propriedades elétricas, facilitando a resposta elétrica gerada pela hibridização entre a sonda (DNA de PCA3) e o analito (RNA de PCA3) para o diagnóstico de câncer de próstata.

[15] Além das aplicações em química analítica, a característica biocompatível do nanotubo de carbono foi verificada em outros trabalhos da literatura, foi evidenciado por Bianco e colaboradores (BIANCO, A.; HOEBEKE, J.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M.; PARTIDOS, C.D. Carbon nanotubes: on the road to deliver. *Current Drug Delivery*, v.2, n.3, p.253-9, 2005) em que a presença dos nanotubos de carbono em culturas celulares ocorreu em diferentes tipos celulares, como HeLa, fibroblastos humanos e de camundongos e queratinócitos, distribuídos pelo citoplasma e no núcleo.

Kostarelos e colaboradores (KOSTARELOS, K.; LACERDA, L.; PASTORIN, G.; WU, W.; WIECKOWSKI, S.; LUANGSIVILAY, J.; GODEFROY, S.; PANTAROTTO, D.; BRIAND, J.; MULLER, S.; PRATO, M.; BIANCO, A. Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature Nanotechnology*, v. 2, n. 2, p. 108-113, 2007.) observaram que nanotubos de parede única (SWCNTs) e parede múltipla (MWCNTs) funcionalizados com diferentes moléculas foram internalizados por várias células, como A549, HeLa, MOD-K, Jurkat e leveduras. Alguns pesquisadores sugerem que eles atravessam de forma passiva a bicamada lipídica, atravessando a membrana sem danificá-la. Além das propriedades biocompatíveis, os nanotubos permitem a migração molecular e iônica, aumentando a condutividade elétrica e melhorando o desempenho de sensores e no sequenciamento de ácidos nucleicos. Essa característica é relativa à sua estrutura de anéis aromáticos com elétrons em ressonância por toda a molécula. Tal ressonância aumenta a condutividade elétrica, essencial em dispositivos eletrônicos.

[16] Na presente invenção, os biossensores puderam ser construídos com uma matriz de quitosana e nanotubos de carbono, pois esses materiais têm sítios de ligação covalente entre moléculas de DNA do PCA3 através do grupo NH₂ e o grupo ácido carboxílico do nanotubo de carbono. Assim, a matriz é ideal para imobilizar a camada ativa com a sequência de DNA. A interação entre a camada ativa e a matriz também se dá por forças eletrostáticas entre os grupos fosfato aniônicos do DNA e os centros catiônicos na superfície dos nanotubos de carbono (FOLDVARI & BAGONLURI, 2008a). A partir desses tipos

de interação, a camada ativa dos biossensores fica mais organizada e com maior número de sítios disponíveis para detecção. Essa escolha de materiais, com quitosana e nanotubos de carbono, possibilitou a alta sensibilidade relatada para os biossensores da presente invenção. Além da alta sensibilidade, a imobilização eficiente da camada ativa (com as sondas de DNA de PCA3) garante maior seletividade na detecção da cadeia complementar de lncRNA de PCA3, evitando interferência de ligações não específicas. Como resultado final, obtêm-se biossensores com alta sensibilidade e numa ampla faixa de concentrações de PCA3, sem falsos positivos na detecção.

[17] Como a presente invenção se refere a biossensores que podem ser implantados para monitoramento e diagnóstico do câncer de próstata, o uso de materiais biocompatíveis, como quitosana e nanotubos de carbono, é essencial. Para a implantação de biossensores, são requeridos agentes que facilitam esse procedimento. O presente biossensor deve ser implantado nas células em que há o biomarcador cancerígeno, no caso, o PCA3 em células da próstata. A estrutura molecular permite a funcionalização com outras biomoléculas, o que também promove entrega controlada de fármacos (DINARVAND, 2012) até a próstata, permitindo uma forte interação com células tumorais prostáticas. Assim, constatou-se que suas propriedades facilitariam a detecção do PCA3 nessas células tumorais. Como os nanotubos de carbono podem ser carreadores de fármacos e penetram até as células cancerígenas da próstata, comprovando sua biocompatibilidade, será possível implantar o biossensor para diagnóstico de câncer de próstata em tempo real.

[18] A penetração dos nanotubos de carbono em células prostáticas tumorais pode ser vantajosa para detectar o RNA do PCA3 nessas células, pois a hibridização entre sonda/RNA nas células ficaria facilitada pelas fortes interações na parede celular. Por isso, escolheu-se a quitosana e os nanotubos de carbono como matriz em conjunto com a sonda de DNA de PCA3 para detecção de câncer de próstata, com a consequente melhoria no desempenho do biossensor.

[19] A plataforma de biossensoriamento utilizada na presente invenção apresenta uma forma de construção versátil que possibilita a sua adaptação para incluir outros materiais de modo que a quitosana pode ser substituída por outros polímeros naturais, como fibroína de seda, e diversas proteínas que propiciem um ambiente adequado para que a sonda de DNA seja imobilizada adequadamente. Também, os nanotubos podem ser substituídos por outros nanomateriais, como grafeno, nanoesferas de carbono e nanopartículas metálicas.

[20] As técnicas de fabricação dos filmes que compõem o biossensor são as de automontagem por adsorção química (do inglês "*self-assembled monolayers*" e usualmente abreviada como SAM) [*Self-assembled Monolayers for Biosensors*] e/ou automontagem por adsorção física (do inglês "*layer-by-layer*" e usualmente abreviada como LbL) [G. Decher, et al.; *Macromolecular Symposia.*, 46,321,1991]. Devido à forma de construção adotada, a presente invenção é capaz de ser confeccionada por outras técnicas de fabricação de filmes nanoestruturados, incluindo a técnica Langmuir-Blodgett (LB) [Oliveira Jr. et al., *Brazilian Journal of Physics*, 22, 1992].

[21] A detecção da hibridização da sonda utilizada na

presente invenção pode ser realizada por técnicas eletroquímicas, como espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica, impedância elétrica e métodos colorimétricos por espectroscopia de UV-vis.

[22] A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica de caracterização elétrica e permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um número grande de processos intercorrelacionados ocorre em diferentes velocidades, e é utilizada em ampla gama de estudos abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas. Em particular, a EIE serve para caracterização de sistemas eletroquímicos que não se alteram no tempo, em outras palavras, é uma técnica de estado estacionário. A resposta da aplicação de um pequeno sinal AC, feita em uma ampla faixa de frequências e em vários potenciais, possibilita diferenciar processos com tempos característicos distintos, que na maioria das técnicas tradicionais eletroquímicas seriam vistos como contribuições simultâneas à resposta total.

[23] Os experimentos baseados em medidas eletroquímicas por voltametria cíclica se caracterizam por processos que resultam de reações redox, que possam ocorrer num eletrodo de trabalho nanoestruturado, por efeito da polarização eletroquímica, entre dois valores de potenciais, E_i e E_f , em que a varredura do potencial é realizada a uma velocidade constante (v). Como resposta da análise, obtém-se uma curva de intensidade de corrente (I) versus potencial aplicado (E). Há uma varredura do potencial a partir de um potencial

inicial (E_i) até um potencial final (E_f), regressando ao potencial inicial, obtendo-se assim uma curva $I \times E$, designada de voltamograma cíclico (VC).

[24] Já as medidas de impedância elétrica foram feitas em um suporte com entrada para dois eletrodos em que um potencial elétrico é aplicado nos contatos e por efeito de polarização age como um capacitor, permitindo-se obter a quantidade de carga entre cada eletrodo.

[25] A detecção por meio de ensaios colorimétricos utiliza os mesmos procedimentos das medidas elétricas, diferindo na utilização de um suporte sólido de quartzo, no qual as moléculas de quitosana, os nanotubos de carbono e a sonda do PCA3 são imobilizadas pela técnica LBL.

[26] A invenção compreende ainda a análise dos dados das medidas elétricas e/ou eletroquímicas por meio de técnicas de visualização de informação, abordagens estatísticas ou computacionais, ou com aprendizado de máquina e inteligência artificial. Esse uso permite distinguir as amostras que continham PCA3 de outros tipos de amostras, como demonstrado na presente invenção.

[27] Os elementos que compreendem a presente invenção e a sua disposição possibilitam a produção em larga escala de biossensores para detecção do PCA3, em que o referido biossensor é de fácil manuseio, podendo ser facilmente operado por qualquer pessoa; a detecção pode ser feita em poucos minutos; o biossensor é de baixo custo e pode ser construído em um curto espaço de tempo; e permite diagnóstico precoce, o prognóstico e o acompanhamento do câncer de próstata.

Estado da técnica:

[28] O documento US 20130183243, "*Methods and device for tuning multiplexed makers for disease assay*", refere-se a um dispositivo de diagnóstico e métodos para ensaios de diagnóstico para monitorar a presença de amostras biológicas em que o dispositivo permite a determinação de pelo menos dois componentes do ensaio em um sensor por meio da técnica da espectroscopia de impedância eletroquímica, compreendendo uma pluralidade de elementos de reconhecimento molecular, com diferentes tipos de elementos de reconhecimento.

[29] O referido documento cita a utilização do antígeno específico da próstata (PSA) no diagnóstico do câncer de próstata, mas ressalta que um único biomarcador costuma ser insuficiente para identificar de forma específica e sensível este tipo de doença.

[30] O documento US 20130183243 consiste em um dispositivo geral que pode detectar tanto o câncer de próstata, utilizando o antígeno PSA, quanto diabetes e catecolamina por meio de enzimas e anticorpos, porém não há uma descrição detalhada do dispositivo proposto, sendo apresentada apenas uma descrição geral.

[31] O referido documento ainda menciona a aplicação da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) a elementos de reconhecimento molecular, como anticorpos, enzimas, receptores e ligantes ou antígenos, DNA, RNA, peptídeos e anticorpos sintéticos, para o desenvolvimento de sensores formados por *nanobeads* magnéticos, esferas de poliestireno, nanotubos de carbono, nanofios, nanocoloides, nanopartículas, *nanorods*, pontos quânticos, nanocristais, lipossomas, nanopartículas, coloides, *nanorods* ou nanopartículas de ouro, prata, titânio, paládio, platina,

níquel, cobre, manganês, titânio e óxidos dos mesmos, com superfícies que consistem em biotina, hidrazina, alcinil, alquilazida, amino, hidroxil, tiol, aldeído, succinil, succinimidil, isocinato, proteínas de ligação éster, estreptavidina, avidina, neuavidina ou biotina.

[32] Sendo assim, o documento US 20130183243 apesar de também descrever um biossensor, não revela ou ensina conhecimentos suficientes para desenvolver um biossensor para detectar o biomarcador PCA3 com alta sensibilidade e seletividade, em que utiliza uma sonda específica de DNA como modelo para a hibridação com uma cadeia de RNA do PCA3, com uma matriz de quitosana e nanotubos de carbono para detecção da hibridização da sonda por meio de técnicas eletroquímicas, como espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica, impedância elétrica e métodos colorimétricos por espectroscopia de UV-vis.

[33] O documento "*Electrochemical biosensors for cancer biomarkers detection: recent advances and challenges*" (DOI: 10.1002/elan.201501174), aborda diferentes tipos de biomarcadores e técnicas de detecção que podem ser utilizadas. Nele, são citados biomarcadores para detecção de câncer de próstata, no entanto não são mostrados resultados que mensuram essa detecção. Ademais, O referido artigo não aborda nenhum tipo de dispositivo usando sonda de RNA/DNA de PCA3, apenas cita que o PCA3 é um tipo de biomarcador para câncer de próstata.

[34] Dessa forma, o documento supracitado, apesar de também descrever um biossensor, não revela ou ensina conhecimentos suficientes para desenvolver um biossensor

para detectar o biomarcador PCA3 com alta sensibilidade e seletividade, em que utiliza uma sonda específica de DNA como modelo para a hibridação com uma cadeia de RNA do PCA3, com uma matriz de quitosana e nanotubos de carbono para detecção da hibridização da sonda por meio de técnicas eletroquímicas, como espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica, impedância elétrica e métodos colorimétricos por espectroscopia de UV-vis.

[35] O documento "*Carbon nanomaterial sensors for cancer and disease diagnosis*" (DOI: 10.1002/9781119373476.ch8) refere-se a um capítulo de livro que lista sensores para detecção de doenças a partir de dispositivos feitos com materiais de carbono. O referido livro não mostra qualquer desenvolvimento de dispositivo para detecção do PCA3, mas menciona na referência 134 (10.1021/acssensors.6b00651), um biossensor óptico/colorimétrico para detecção de mRNA de doença de Alzheimer e Câncer de Próstata a partir de nanopartículas de NaYF₄:Yb, Er. Porém, diferentemente do trabalho de Vilela e colaboradores [doi:10.1021/acssensors.6b00651], a matéria desta patente aborda biossensores para detecção específica do PCA3, tendo a impedância elétrica e espectroscopia UV-VIS como modos de transdução. Estes tipos de transdução são mais simples do que as demais, principalmente comparando com a impedância eletroquímica, pois não necessitam de eletrodos de referência e contra-eletrodos, o que torna os dispositivos de fácil e rápida construção. Devido à sua versatilidade, o dispositivo descrito na presente invenção proporciona portabilidade para outros tipos de transdução,

principalmente a impedância eletroquímica, o que não é mencionado no referido documento e nem no artigo da referência 134.

[36] O documento "*A new self-assembled layer-by-layer glucose biosensor based on chitosan biopolymer entrapped enzyme with nitrogen doped graphene*" (DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.06.004>), citado anteriormente como referência 134, descreve um imunoensaio colorimétrico a partir nanopartículas de NaYF₄:Yb,Er (UCNPs) como emissores de fluorescência, com tempo de síntese de aproximadamente 4h30min e óxido de grafeno (GO) como inibidor de fluorescência. Vilela et al usaram cadeias de DNA de 25-meros, funcionalizadas com amino-hexil para funcionalização das nanopartículas (UCNPs) recobertas com poli (ácido acrílico), via acoplamento EDC/NHS.

[37] De fato, o uso destas nanopartículas permite que o autor realize diagnósticos em soluções de grande volume (ordem de mL). No trabalho tema desta patente, os autores utilizam uma matriz composta de quitosana com nanotubos de carbono, depositada sobre eletrodos de Au e substratos de quartzo em apenas 20min, com volumes de solução na faixa de µL e que pode conferir a possibilidade de implantação em humanos, já que os materiais escolhidos apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além da vantagem biológica, a construção dos biossensores desta patente permite a miniaturização do dispositivo, já que a área ativa dos eletrodos utilizados neste trabalho é no máximo de 1 mm². Essa matriz de materiais biocompatíveis pode auxiliar no ordenamento molecular da camada ativa, melhorando os parâmetros analíticos dos dispositivos. Apesar do trabalho

de Vilela mencionar um dispositivo com limite de detecção na faixa de fM, o biossensor da presente invenção alcançou limite de detecção da ordem de pM, que é competitivo em relação ao mencionado no trabalho citado.

[38] Além do tipo de transdução e dos tipos de materiais usados na detecção, outra vantagem da presente invenção frente ao referido documento está na sequência de DNA escolhida. Enquanto, a sequência de PCA3 do referido documento citado apresenta funcionalização com amino-hexil e 25 bases nitrogenadas, a presente invenção apresenta uma sequência funcionalizada apenas com grupo NH₂ e 21 bases nitrogenadas. De fato, não há uma influência biológica do comprimento da cadeia e do grupo funcional, contudo na bioeletrônica o comprimento influencia no sinal da medida elétrica. Quando o equipamento aplica um potencial elétrico no sensor e detecta a variação da corrente elétrica, há uma organização molecular e iônica na interface eletrodo/solução, formando uma dupla camada elétrica, que é perturbada com as interações sonda-alvo do PCA3. Para melhor desempenho dos biossensores descritos na presente invenção é necessário que a reação sonda-alvo ocorra mais próxima à superfície do eletrodo, pois a dupla camada elétrica é menos perturbada. Isso auxilia na aquisição dos dados e, conseqüentemente, pode influenciar nos parâmetros analíticos.

[39] O artigo "*Highly sensitive detection of prostate cancer specific pca3 mimic dna using sersbasedcompetitive lateral flow assay*" (DOI: 10.1039/c9nr04864b), utiliza a técnica SERS (Raman), diferentemente da técnica da patente submetida. Uma técnica óptica, de alto custo e inadequada

para ser empregada em hospitais ou clínicas de saúde devido ao seu custo e às dimensões do equipamento. Ademais, a referida técnica emprega um procedimento experimental bastante complexo, que contém várias etapas até a detecção. Ainda, vale ressaltar que as sequências de DNA empregadas são diferentes das empregadas na presente invenção.

[40] Adicionalmente, diferente da presente invenção, o referido artigo não emprega um filme como biossensor, mas sim uma solução que contém vários elementos em sua composição, como estreptavidina, biotina, nanopartículas de ouro, sondas e DNA, em que as nanopartículas de ouro são responsáveis pelo baixo limite de detecção, pois elas melhoram a qualidade do sinal. Porém, o biossensor se torna de alto custo e de difícil produção. Sendo assim, o trabalho relatado no artigo não revela ou ensina os conceitos aplicados à presente invenção para detecção do PCA3, uma vez que o princípio de detecção e os sensores são substancialmente diferentes.

Breve descrição da invenção:

[41] A presente invenção refere-se a um biossensor para detecção do biomarcador PCA3 em amostras de urina e em amostras que contenham células tumorais da próstata, para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento do câncer de próstata. O dispositivo da presente invenção é produzido a partir dos eletrodos descartáveis e de baixo custo que detectam o PCA3 a partir de técnicas eletroquímicas, elétricas ou colorimétricas. O biossensor é compreendido preferencialmente por um eletrodo de ouro recoberto por uma matriz de quitosana e nanotubos de carbono que são ligados a uma sonda específica de DNA para hibridização com o PCA3,

conferindo ao biossensor alta sensibilidade e seletividade.

Breve descrição das figuras:

[42] Para obter uma total e completa visualização do objeto desta invenção, são apresentadas as figuras as quais se faz referências, conforme se segue.

[43] A figura 1 mostra um esquema da construção de um interdígito do biossensor da presente invenção em sua configuração preferencial, em que a porção cinza do filme nanoestruturado (2) representa os nanotubos de carbono e a porção amarela a quitosana.

[44] A figura 2 mostra o gráfico de espectro de PM IRRAS para o filme de quitosana para os controles positivo e negativo, em sua configuração preferencial.

[45] A figura 3 mostra o gráfico de espectro de PM IRRAS para o filme de nano tubos de carbono para os controles positivo e negativo, em sua configuração preferencial.

[46] A figura 4 mostra o gráfico de espectro de PM IRRAS para a sonda de PCA3 para os controles positivo e negativo, em sua configuração preferencial.

[47] A figura 5 mostra o gráfico de espectro de PM IRRAS para a sonda de PCA3 para os controles positivo e negativo, em sua configuração preferencial.

[48] A figura 6 mostra o gráfico de Nyquist dos espectros de impedância de 100 kHz a 1 Hz para um eletrodo de ouro modificado com quitosana, nanotubos de carbono e a sonda de PCA3 exposto a concentrações variáveis do controle positivo e controle negativo de PCA3 em $K_3Fe(CN)_6$ e $K_4Fe(CN)_6$ do biossensor em sua configuração preferencial.

[49] A figura 7 mostra o gráfico da mudança relativa da resistência de transferência de carga (R_{ct}) contra a

concentração de controle positivo e negativo da amostra de PCA3 do biossensor em sua configuração preferencial.

[50] A figura 8 mostra o gráfico do espectro de capacitância para o filme de quitosana, nanotubos de carbono e sonda de PCA3 exposto a diferentes concentrações (em mol/L) do biomarcador PCA3 em meio a PBS do biossensor em sua configuração preferencial.

[51] A figura 9 mostra o gráfico de coordenadas paralelas para os dados de capacitância medidos para o filme de quitosana, nanotubos de carbono e sonda de PCA3 em diferentes concentrações de PCA3 do biossensor em sua configuração preferencial, em que um grande número de caixas azuis na parte superior do gráfico indica que muitas frequências são adequadas para distinguir entre as diferentes amostras, representadas por cores diferentes, isto é, tinham altos coeficientes de silhueta.

[52] A figura 10 mostra o gráfico da mudança na capacitância (nF) versus concentração de RNA do PCA3 a 10 Hz do biossensor na sua configuração preferencial.

[53] A figura 11 mostra o gráfico com o método de visualização denominado *Interactive Document Mapping* (IDMAP) para as curvas Z versus frequência para diferentes concentrações de RNA de PCA3 e controle negativo do biossensor em sua configuração preferencial.

[54] A figura 12 mostra o gráfico IDMAP para os espectros de capacitância obtidos de amostras de células com e sem biomarcador de RNA de PCA3 utilizando o biossensor na sua configuração preferencial.

[55] A figura 13 mostra imagens de AFM dos filmes contendo a sonda de PCA3 do biossensor na sua configuração

preferencial.

[56] A figura 14 mostra imagens de AFM dos filmes contendo sonda de PCA3 e o controle positivo para o PCA3 do biossensor na sua configuração preferencial.

[57] A figura 15 mostra imagens de AFM dos filmes contendo sonda de PCA3 e o controle negativo para o PCA3 do biossensor na sua configuração preferencial.

Descrição detalhada da invenção:

[58] A presente invenção refere-se a um biossensor para detecção do biomarcador PCA3 em qualquer amostra biológica para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento do câncer de próstata. O biossensor compreende em sua configuração preferencial pelo menos um eletrodo (1) recoberto por uma matriz (2) ligada a sonda (3) em que o referido eletrodo (1) é conectado a um elemento transdutor (4).

[59] O eletrodo (1) tem a função de sustentar todos os componentes do biossensor e transmitir o sinal elétrico gerado pela hibridização da sonda (3) para o elemento transdutor (4), podendo ser do tipo interdigitado ou placas paralelas, sendo preferencialmente interdigitados, em que o referido eletrodo (1) compreende preferencialmente em uma base (1.1) e um revestimento (1.2). Quando o biossensor é do tipo interdigitado, o eletrodo apresenta uma quantidade de interdígitos na faixa de 8 a 100, com largura de 4 a 50 μm e distância entre os dígitos de 10 a 30 μm , sendo preferencialmente 50 pares de dígitos com largura de 10 μm e distância entre os dígitos de 10 μm .

[60] A base (1.1) é responsável por dar forma ao biossensor, sustentar os demais componentes do biossensor e

pode ser confeccionada preferencialmente em vidro.

[61] O revestimento (1.2) é uma fina camada de um elemento condutor que reveste a base (1.1), tendo a função de transmitir o sinal elétrico do eletrodo (1) para o elemento transdutor (4) e pode ser confeccionado em ouro, carbono, platina, óxido de estanho dopado com índio (ITO), óxido de estanho dopado com flúor (FTO) por meio de diversas técnicas, incluindo impressão, evaporação sob vácuo, deposição eletroquímica, sendo preferencialmente de ouro depositado por meio da técnica de *eléttron bean*.

[62] A matriz (2) tem a função de auxiliar a imobilização da sonda (3) à superfície do eletrodo (1), pode ser compreendida por um filme nanoestruturado de quitosana e nanotubos de carbono, em que o polissacarídeo serve para manter a atividade de biomoléculas e os nanotubos podem contribuir significativamente para a detecção da hibridização da sonda (3) pela sua boa condutividade elétrica, e assim, aumentando a sensibilidade do biossensor.

[63] Os nanotubos de carbono são preferencialmente de parede múltipla, preparados por deposição química a vapor (CVD) contendo grupos de ácido carboxílico ligados por tratamento com agentes oxidantes, e, o polissacarídeo quitosana é composto por unidades de glucosamina e N-acetilglucosamina ligadas por 1-4 ligações glucosídicas, com um grau de acetilação (GA) entre 5% e 24% e peso molecular médio (Mw) entre 127000 e 1000000 gmol^{-1} , escolhidos pela capacidade de preservar a atividade de biomoléculas. Outros produtos usados foram N-etil-N- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS).

[64] Devido à plataforma de biossensoriamento adotada,

a quitosana pode ser substituída por outros polímeros naturais, como fibroína de seda, e diversas proteínas que propiciem ambiente adequado para que a sonda (3) seja imobilizada adequadamente. Os nanotubos podem ser substituídos por outros nanomateriais, como grafeno, nanoesferas de carbono e nanopartículas metálicas.

[65] As técnicas de fabricação dos filmes, que compõem a matriz (2) que podem ser empregadas, são as de automontagem por adsorção química (SAM), automontagem por adsorção física (LbL) ou técnica Langmuir-Blodgett (LB), sendo preferencialmente confeccionadas imergindo o eletrodo numa solução de quitosana a 1 mg/mL durante 10 min, seguido por um tempo de adsorção de 20 min para a camada de nanotubos de carbono, onde os grupos carboxílicos dos nanotubos de carbono foram modificados por imersão do filme em solução de 0,1 mol/L de EDC e 0,1 mol/L (NHS) (1: 1), a fim de preparar a superfície para a ligação com a cadeia da sonda (3). Além disso, ainda é possível fazer uso de outras combinações de materiais para confecção da matriz (2) como por exemplo, serem usados materiais a base de carbono (grafeno, nanotubos), polímeros condutores (polianilina, polipirrol, poliortometoxianilina), polímeros de fontes naturais (quitosana, ácido hialurônico, celulose e nanonofibras) e nanocompósitos polímero/cerâmica.

[66] Para a matriz (2) ser capaz de receber a sonda, (3) é necessária a ativação da matriz (2), em que a referida ativação se dá por meio de uma solução de N-Hidroxisuccinimida e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (NHS/EDC).

[67] A sonda (3) é o elemento do biossensor que detecta

o PCA3 por meio da sua ligação direta com a molécula do PCA3. É compreendida por um ssDNA que possui a sequência [NH₂-C12]-tttttttcccagggatctctgtgcttcc (SEQ ID NO: 1) com um grupo amina e uma cadeia de 12 carbonos, em uma extremidade da cadeia, em que a referida sonda (3) se liga à sequência GGAAGCACAGAGATCCCTGGG do RNA do PCA3. Na presente invenção, a sonda (3) é misturada a um tampão PBS 1x, pH 7 e gotejada sobre o eletrodo.

[68] O elemento transdutor (4) compreende os elementos que traduzem o biorreconhecimento entre sonda de DNA e molécula alvo de RNA, em um sinal mensurável. Para a presente patente, foram empregados os transdutores baseados em impedância elétrica (elétrico), impedância eletroquímica (eletroquímico), além da possibilidade de aplicação desses sensores a partir de transdutores ópticos, gravimétricos e colorimétricos.

[69] Diferentes formas de detecção podem ser utilizadas pela presente invenção desde técnicas eletroquímicas, como espectroscopia de impedância eletroquímica e voltametria cíclica, impedância elétrica a métodos colorimétricos por espectroscopia de UV-vis.

[70] A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica de caracterização elétrica e permite estudar o comportamento geral de um sistema quando um número grande de processos intercorrelacionados ocorre em diferentes velocidades. A EIE é utilizada em ampla gama de estudos, abrangendo desde o transporte eletrônico em dispositivos semicondutores até o estudo de processos cinéticos eletroquímicos das mais diferentes naturezas. Em particular, a EIE serve para caracterização de sistemas eletroquímicos

que não se alteram no tempo, em outras palavras, é uma técnica de estado estacionário. A resposta da aplicação de um pequeno sinal AC, feita em uma ampla faixa de frequências e em vários potenciais, possibilita diferenciar processos com tempos característicos distintos, que na maioria das técnicas tradicionais eletroquímicas seriam vistos como contribuições simultâneas à resposta total.

[71] Os experimentos baseados em medidas eletroquímicas por voltametria cíclica se caracterizam por processos que resultam de reações redox, que possam ocorrer num eletrodo de trabalho nanoestruturado, por efeito da polarização eletroquímica, entre dois valores de potenciais, E_i e E_f . A varredura do potencial é realizada a uma velocidade constante (v). Como resposta da análise, obtém-se uma curva de intensidade de corrente (I) versus potencial aplicado (E). Há uma varredura do potencial a partir de um potencial inicial (E_i) até um potencial final (E_f), regressando ao potencial inicial, obtendo-se assim uma curva I vs. E designada de voltamograma cíclico (VC).

[72] As medidas são realizadas em uma célula de vidro termostatzada de 25 mL a 25°C, com configuração para entrada de três eletrodos: a matriz (2) depositada no eletrodo (1) interdigitado de ouro como eletrodo de trabalho com área geométrica de 9,5 mm², eletrodo de Ag/AgCl contendo 3 mol/L de KCl como eletrodo de referência e um fio de platina com 1,0 cm² de área como contra-eletrodo. Os dados de EIS foram obtidos na faixa de frequência entre 0,1 Hz e 100 kHz com amplitude de 10 mV e sob condições de circuito aberto em solução contendo 5,0 mmol/L de $K_3 [Fe (CN)_6] / K_4 [Fe (CN)_6]$.

[73] Já as medidas de impedância elétrica foram feitas

em um suporte com entrada para dois eletrodos (1). O eletrodo (1) interdigitado empregado nas medidas de impedância elétrica é único, não apresenta contra eletrodo e nem eletrodo de referência. Um potencial elétrico é aplicado nos contatos e por efeito de polarização age como um capacitor, permitindo-se obter a quantidade de carga entre os interdígitos.

[74] A partir de ensaios colorimétricos também é possível realizar a detecção do biomarcador PCA3 para câncer de próstata. Os procedimentos para a realização dessas medidas são os mesmos adotados para as medidas elétricas, o que difere é apenas o suporte sólido utilizado no biossensor, ou seja, base (1.1) de quartzo de 1,2 x 2,5 cm, no qual as moléculas de quitosana e nanotubos de carbono e a sonda (3), são imobilizadas pela mesma técnica anterior, camada sobre camada.

[75] Após cada imobilização de diferentes concentrações da cadeia do PCA3, durante 1 h sobre a matriz (2) formada sobre a base (1.1) de quartzo, uma medição no equipamento de UV vis é realizada. Com o aumento da concentração de cadeias de PCA3 imobilizadas, há uma variação na absorbância do biossensor.

Exemplos de concretização

Exemplo 1

[76] Os biossensores são fabricados utilizando uma matriz (2) e obtidos pela técnica camada por camada de quitosana e nanotubos de carbono depositados em eletrodos (1) de ouro e então, revestidos com uma camada da sonda (3) de DNA de PCA3. A bicamada quitosana/nanotubos de carbono é produzida por imersão do eletrodo em uma solução de 1 mg/mL

de quitosana por 10 min, seguido por um tempo de adsorção de 20 min para a camada de nanotubos de carbono. Os grupos carboxílicos dos nanotubos de carbono são modificados por imersão do filme em EDC 0,1 mol/L e solução 0,1 mol/L (NHS) (1:1), que prepara a superfície para a ligação com a sonda (3) de DNA de PCA3.

[77] A detecção do biomarcador PCA3 é realizada a partir de soluções de PCA3 em PBS que são preparadas com diferentes concentrações, por exemplo entre 10^{-6} e 10^{-16} mol/L. Para cada concentração, uma unidade de biossensor foi imersa por uma hora a 60°C . Após a adsorção do biomarcador sobre o biossensor, este foi lavado para eliminar ou minimizar a adsorção não específica.

[78] A espectroscopia de impedância elétrica é um dos métodos empregados, a partir de um modelo Solartron 1260 A (Solartron Analytical, EUA), na faixa entre 10^2 e 10^6 Hz e os resultados da detecção são mostrados nas Figuras 8 e 10.

Exemplo 2

[79] A matriz (2) é confeccionada pela técnica camada por camada de quitosana e nanotubos de carbono depositados em eletrodos (1) de ouro e então revestidos com uma camada da sonda (3) de DNA de PCA3. A bicamada quitosana/nanotubos de carbono foi produzida por imersão do eletrodo em uma solução de 1 mg/mL de quitosana por 10 min, seguido por um tempo de adsorção de 20 min para a camada de nanotubos de carbono. Os grupos carboxílicos dos nanotubos de carbono foram modificados por imersão do filme em EDC 0,1 mol/L e solução 0,1 mol/L (NHS) (1:1), que prepara a superfície para a ligação com a sonda (3) de DNA de PCA3.

[80] A detecção do biomarcador PCA3 foi realizada a

partir de soluções de PCA3 em PBS preparadas com diferentes concentrações. Para cada concentração, uma unidade de biossensor foi imersa por uma hora a 60°C. Após a adsorção, o biossensor é lavado para eliminar ou minimizar a adsorção não específica.

[81] A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi empregada com um potenciostato/galvanostato Autolab PG STAT, 204 (Eco Chimie, Holanda) controlado pelo software NOVA. As medidas foram feitas em uma célula de vidro termostatzada de 25 mL a 25°C, com configuração de três eletrodos (1): a matriz (2) nanoestruturada depositada no eletrodo de ouro serviu como eletrodo de trabalho (área geométrica de 9,5 mm²), o eletrodo de referência foi de Ag/AgCl (3 mol/L KCl) e uma folha de platina (1,0 cm²) era usada como eletrodo auxiliar.

[82] A solução na célula não foi agitada nem arejada durante as medidas. Os dados de EIS foram obtidos na faixa de frequência entre 0,1 Hz e 100 kHz com amplitude de 10 mV e sob condições de circuito aberto em solução contendo 5,0 mmol/L de K₃[Fe(CN)₆]/K₄[Fe(CN)₆]. Os resultados da detecção são mostrados nas Figuras 6 e 7.

[83] A adsorção de cada camada de cada versão da presente invenção foi monitorada com espectroscopia de absorção de reflexão infravermelha modulada por polarização (PM-IRRAS) e microscopia de força atômica (AFM). Os espectros PM-IRRAS são obtidos em um espectrofotômetro KSV, modelo PMI 550 (KSV Instruments, Finlândia), com resolução espectral de 8 cm⁻¹ e com ângulo de incidência de 81°. As imagens do AFM são realizadas usando um microscópio Bruker Dimension FastScan. Os experimentos apresentaram reprodutibilidade

para as matrizes (2) que constituem os biossensores produzidos com a técnica de deposição camada por camada, e com ambas as técnicas de detecção, PM-IRRAS e AFM.

[84] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Biossensor para detecção do biomarcador PCA3 **caracterizado** pelo fato de compreender pelo menos um eletrodo (1) recoberto por uma matriz (2) de quitosana e nanotubos de carbono e ligada a uma sonda (3);

em que o referido eletrodo (1) é conectado a um elemento transdutor (4); e

a sonda (3) ser compreendida por um ssDNA que possui a sequência SEQ ID NO: 1 com um grupo amina e uma cadeia de 12 carbonos em uma extremidade da cadeia.

2. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de o eletrodo (1) ser do tipo interdigitado com uma quantidade de interdígitos na faixa de 8 a 100, com largura de 4 a 50 μm e distância entre os dígitos de 10 a 30 μm .

3. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de o revestimento (1.2) do eletrodo (1) poder ser confeccionado de ouro, carbono, platina, óxido de estanho dopado com índio (ITO), óxido de estanho dopado com flúor (FTO) por meio de diversas técnicas, incluindo impressão, evaporação sob vácuo, deposição eletroquímica, sendo preferencialmente de ouro depositado por meio da técnica de *elétron bean*.

4. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de os nanotubos de carbono serem de parede múltipla, preparados por deposição química a vapor (CVD) contendo grupos de ácido carboxílico ligados por tratamento com agentes oxidantes

5. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de a quitosana

ser composta por unidades de glucosamina e N-acetilglucosamina ligadas por 1-4 ligações glucosídicas, com um grau de acetilação (GA) entre 5% e 24% e peso molecular médio (Mw) entre 127000 e 1000000 g mol^{-1} .

6. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de a quitosana poder ser substituída por fibroína de seda.

7. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de os nanotubos de carbono poderem ser substituídos por grafeno, nanoesferas de carbono ou nanopartículas metálicas.

8. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizado** pelo fato de a matriz (2) ser confeccionada por automontagem por adsorção química (SAM), automontagem por adsorção física (LbL) ou técnica Langmuir-Blodgett (LB).

9. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de o elemento transdutor (4) poder ser baseado em impedância elétrica (elétrico), impedância eletroquímica (eletroquímico), ópticos, gravimétricos ou colorimétricos.

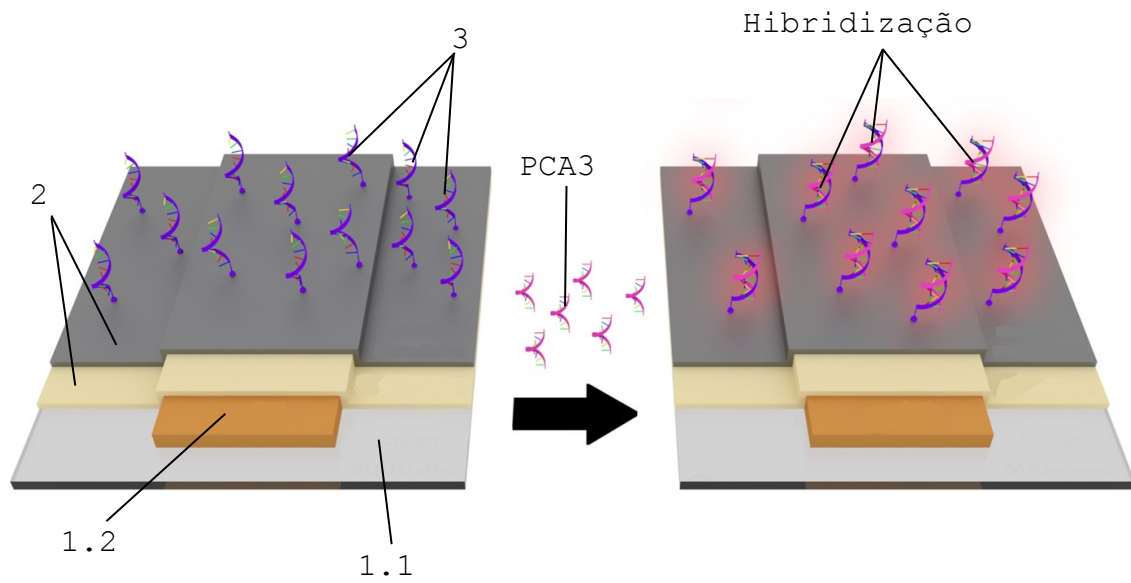


Figura 1

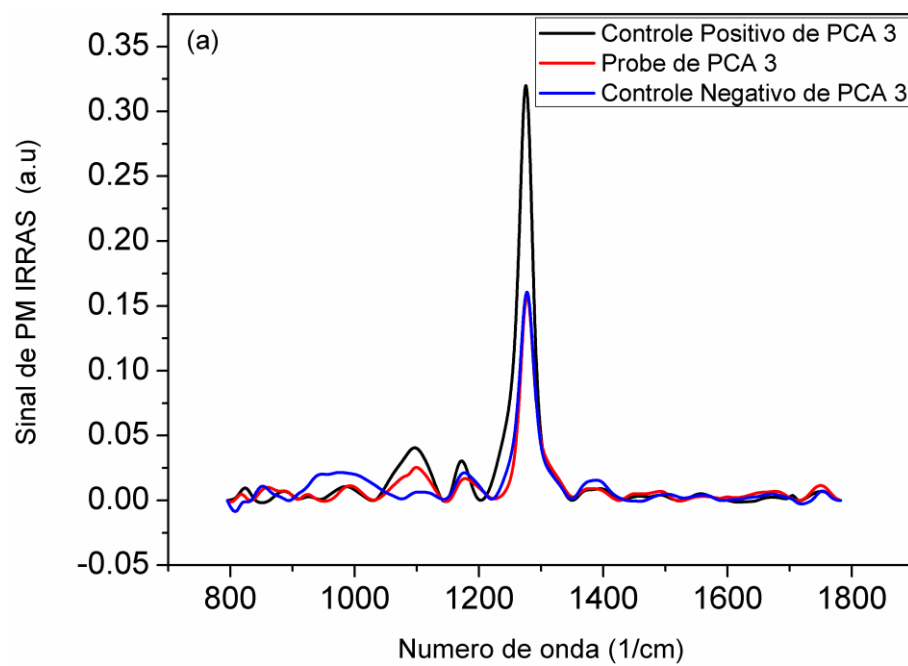


Figura 2

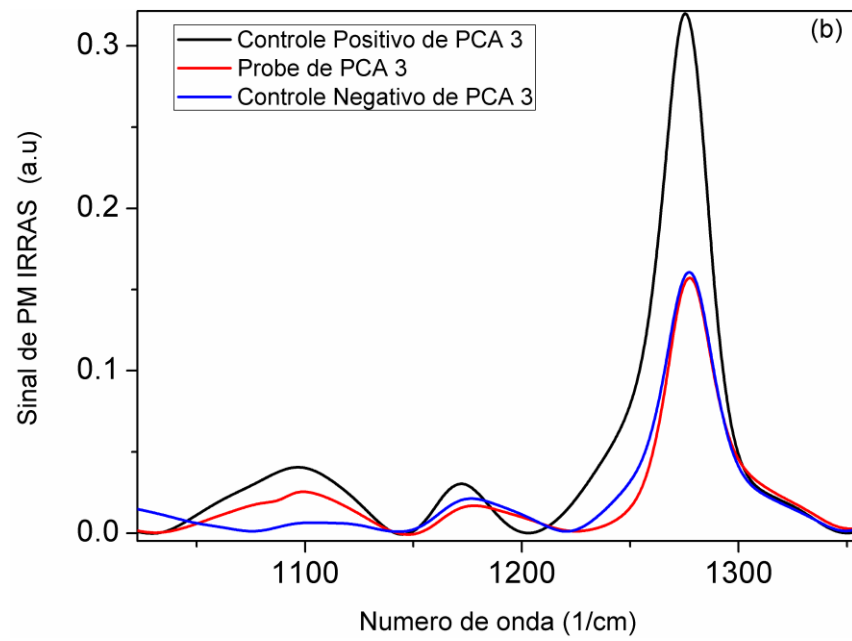


Figura 3

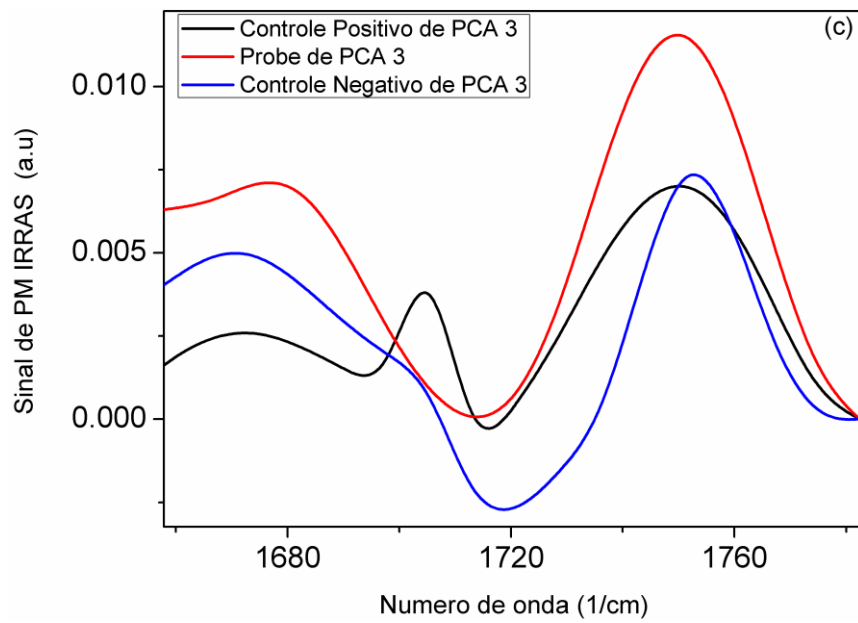


Figura 4

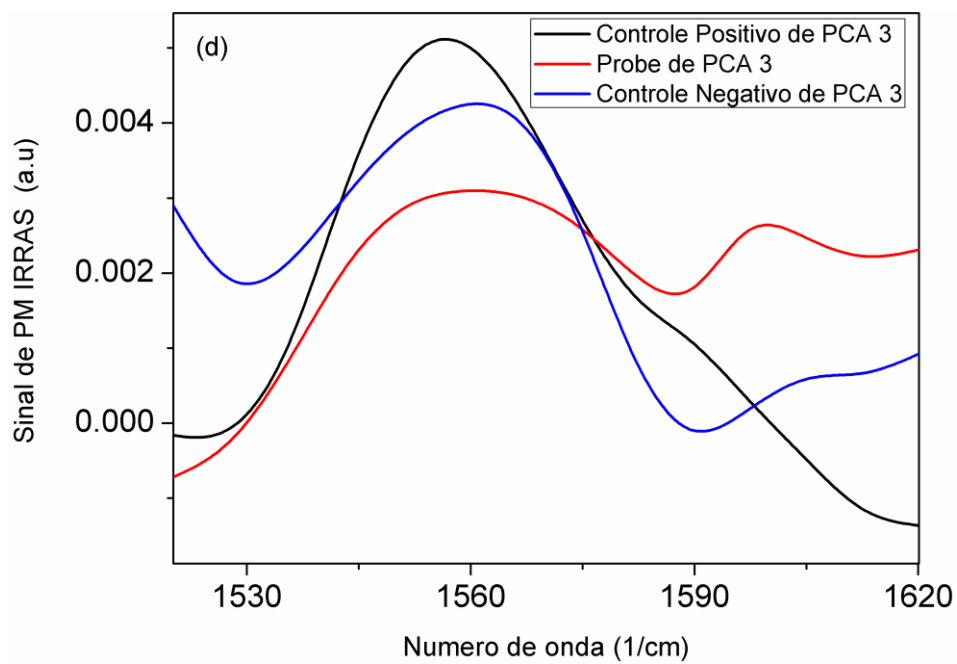


Figura 5

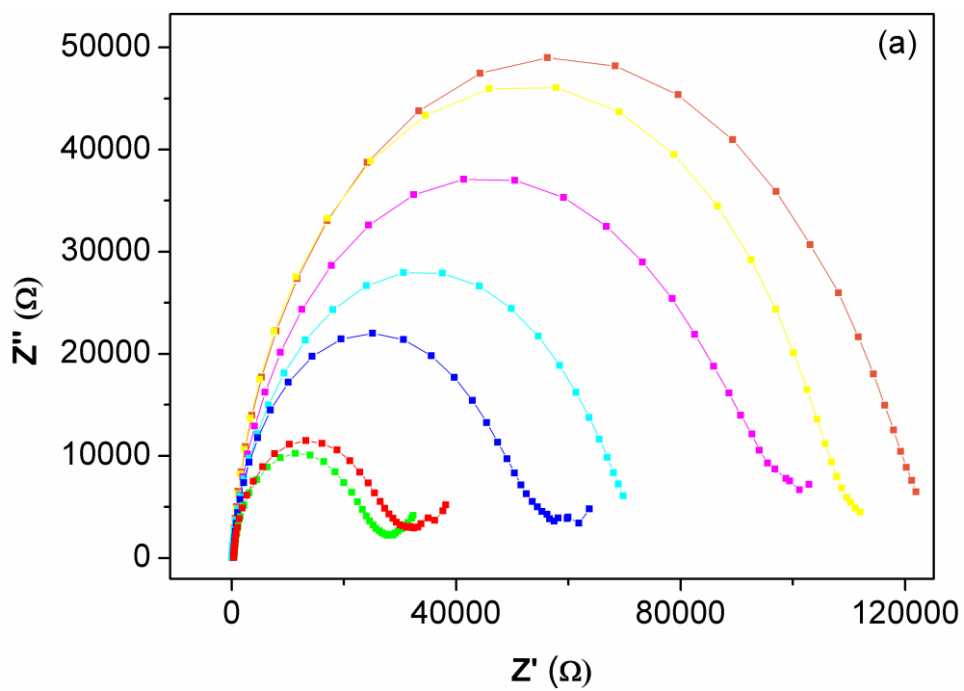


Figura 6

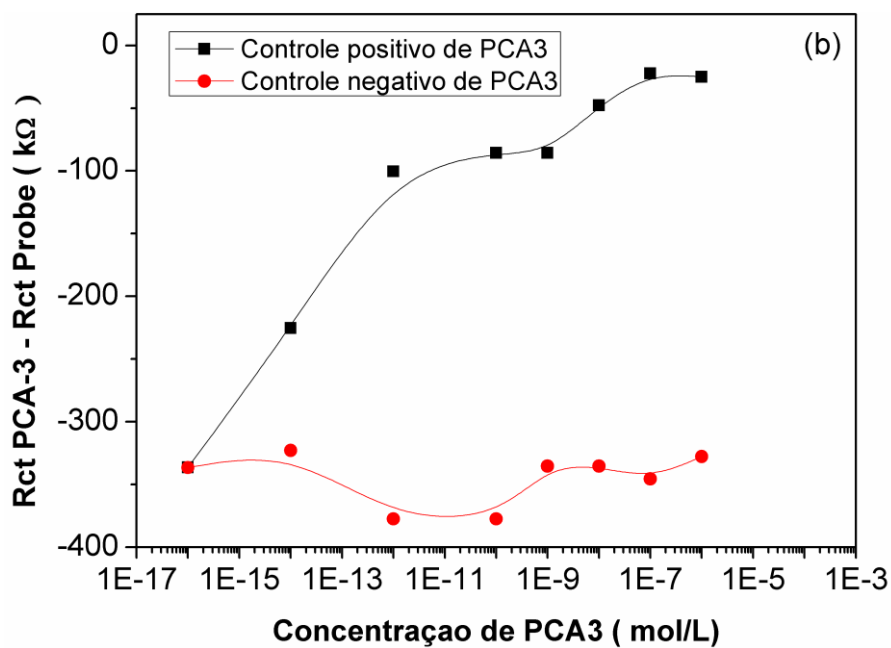


Figura 7

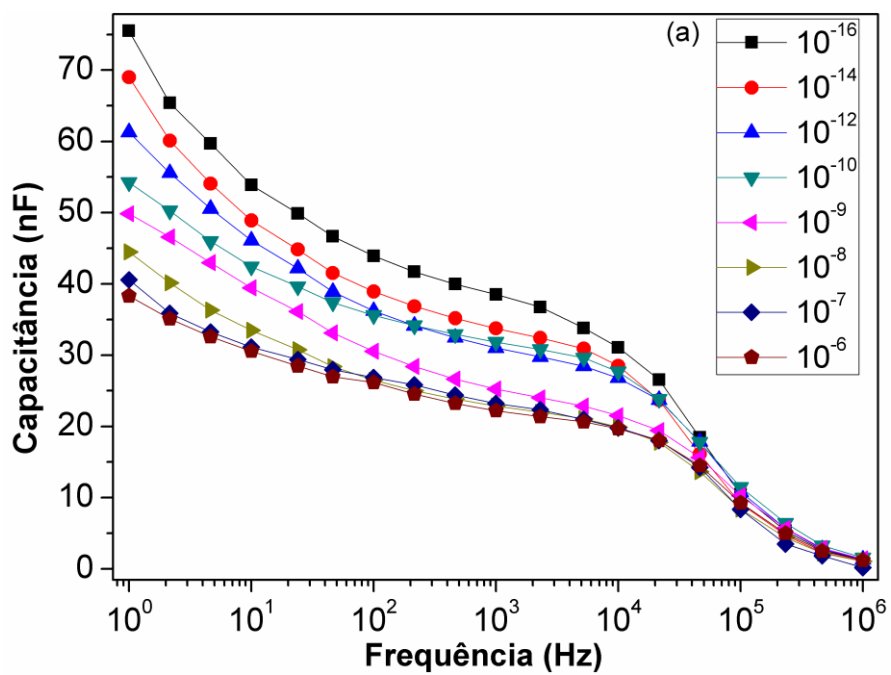


Figura 8

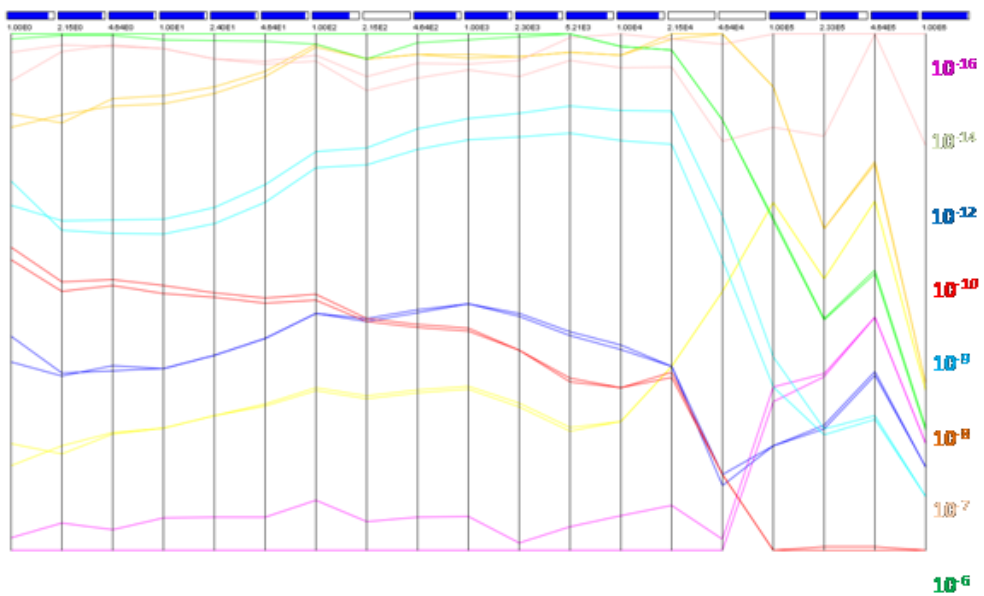


Figura 9

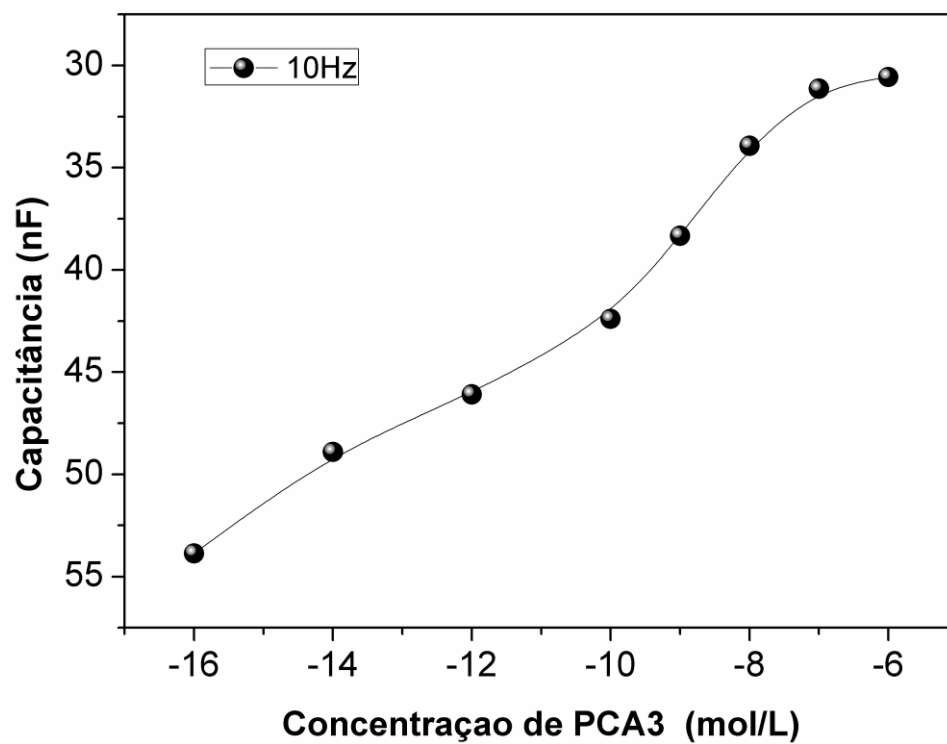


Figura 10

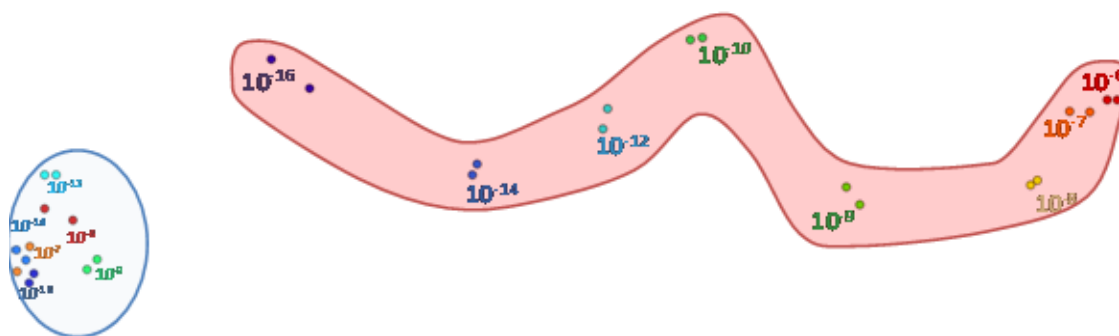


Figura 11

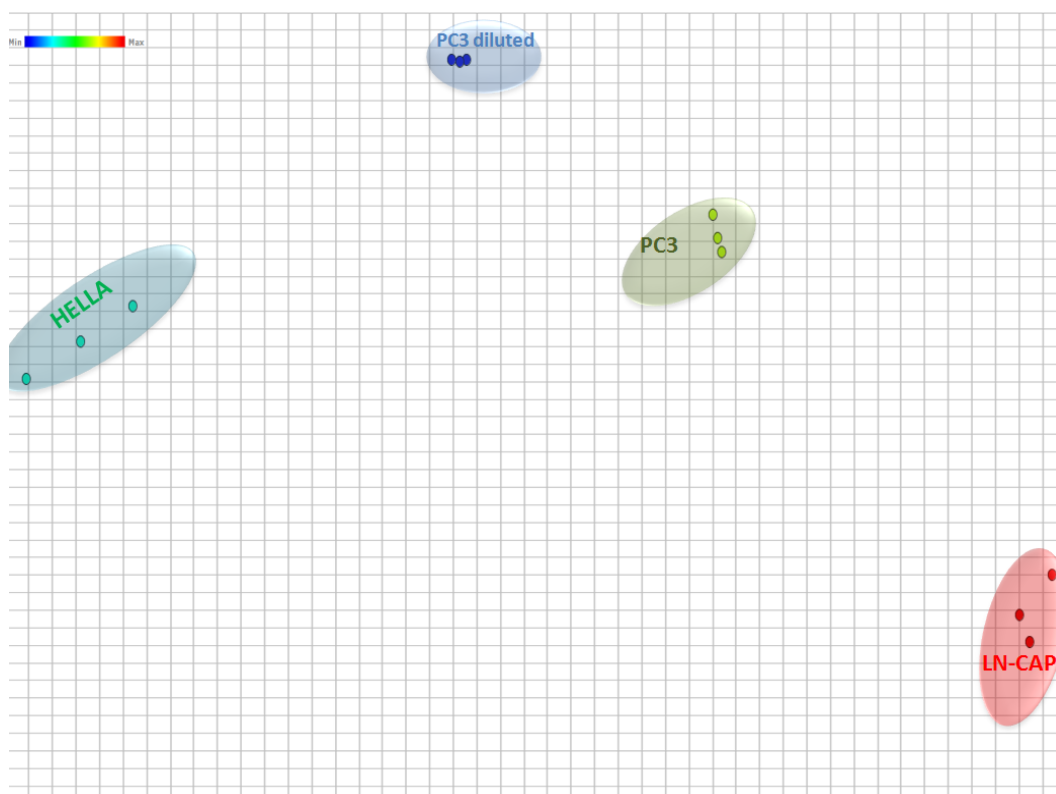


Figura 12

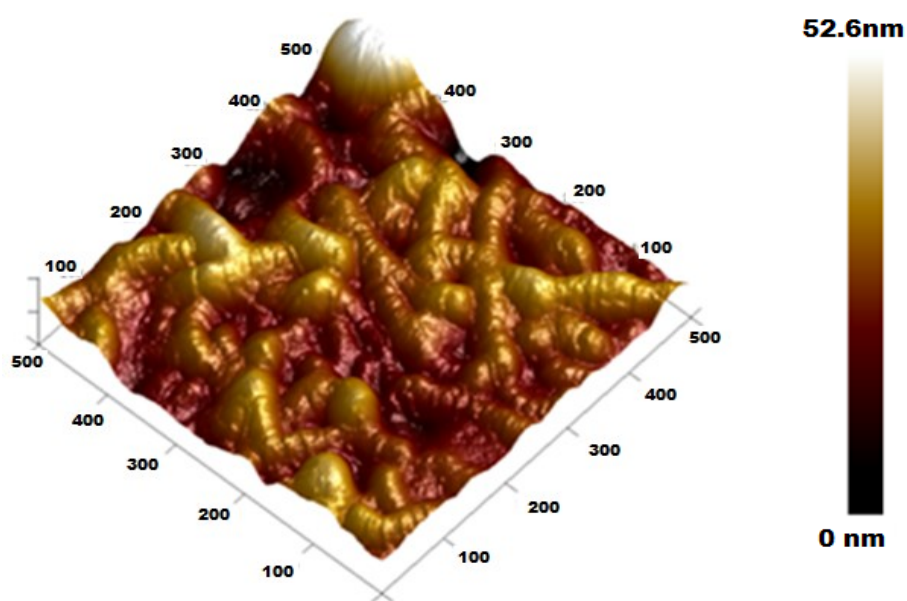


Figura 13

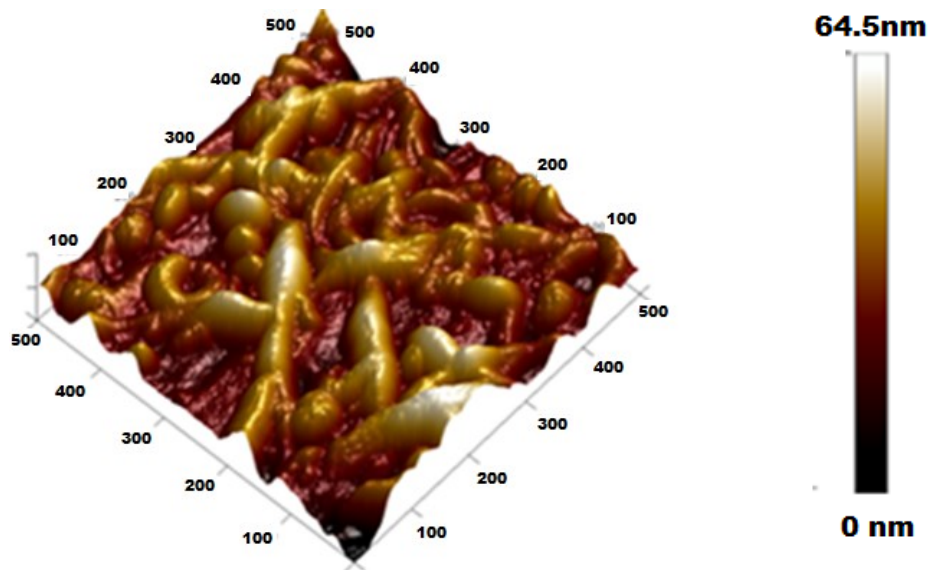


Figura 14

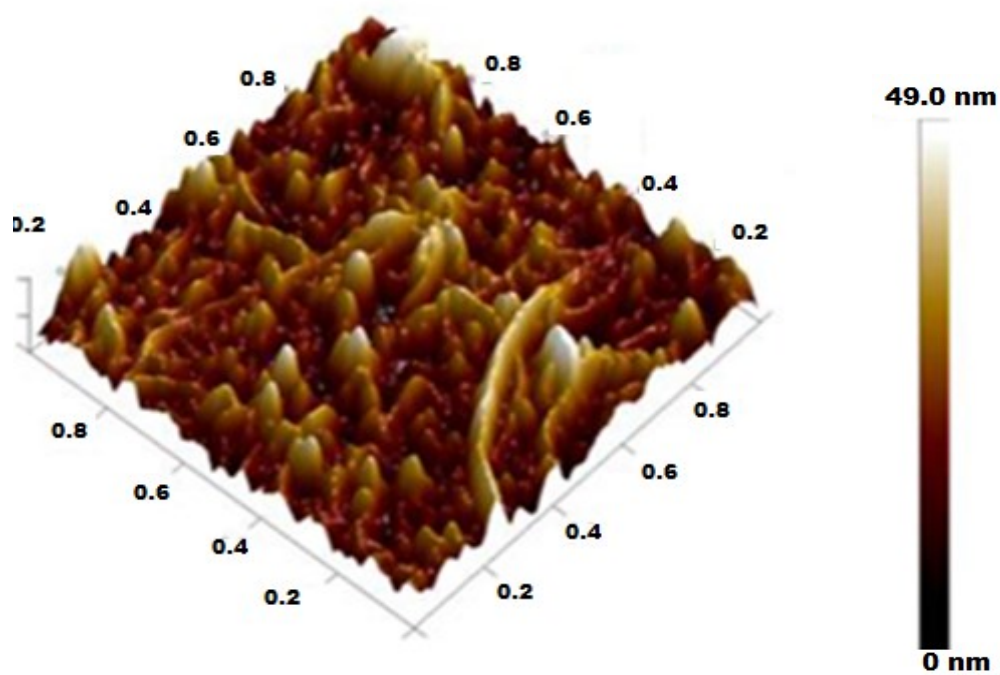


Figura 15

RESUMO**BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR PCA3**

A presente invenção refere-se a um biossensor para detecção do biomarcador PCA3 em qualquer amostra biológica para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento do câncer de próstata. O dispositivo da presente invenção é produzido a partir de eletrodos descartáveis e de baixo custo que detectam o PCA3 a partir de técnicas eletroquímicas, elétricas ou colorimétricas. O biossensor é compreendido preferencialmente por um eletrodo de ouro recoberto por uma matriz de quitosana e nanotubos de carbono que são ligados a uma sonda específica de DNA para hibridização com o PCA3, conferindo ao biossensor alta sensibilidade e seletividade.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: Listagem de sequência - câncer de próstata.txt
- Data de Geração do Código: 25/11/2020
- Hora de Geração do Código: 16:25:27
- Código de Controle:
 - Campo 1: 1C910351F7073A76
 - Campo 2: 28FFB3066F36289A