



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

(21) BR 102019021171-7 A2



(22) Data do Depósito: 08/10/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 15/02/2022

(54) **Título:** BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV-16), PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSENSOR E KIT DE DETECÇÃO PARA HPV-16

(51) **Int. Cl.:** G01N 33/569; G01N 27/02.

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

(72) **Inventor(es):** OSVALDO NOVAIS DE OLIVEIRA JUNIOR; ANA CAROLINA DE CARVALHO PETERS; ANDRÉ LOPES CARVALHO; ANDREY COATRINI SOARES; JOSÉ HUMBERTO TAVARES GUERREIRO FREGNANI; JULIANA COATRINI SOARES; LIDIA MARIA REBOLHO BATISTA ARANTES; MATIAS ELISEO MELENDEZ; RUI MANUEL VIEIRA REIS; VALQUIRIA DA CRUZ RODRIGUES.

(57) **Resumo:** BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV16), PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSENSOR E KIT DE DETECÇÃO PARA HPV-16. A presente invenção refere-se a um biossensor para detecção de papilomavírus humano (HPV-16) através da variação de impedância, formado por um eletrodo interdigitado, uma sonda de DNA específica e matriz de sulfato de condroitina e quitosana. A presente invenção refere-se também a um kit de detecção compreendendo o biossensor e meios para solubilização da amostra. A presente invenção ainda apresenta o processo de produção do referido biossensor. A presente invenção apresentou um desempenho muito superior ao de outros dispositivos similares, com limites de detecção na ordem de picomolar (pM) e ausência de interferentes nos testes de seletividade dos biossensores.

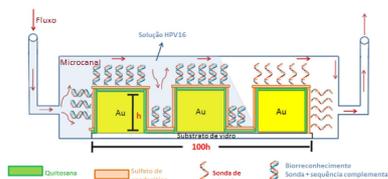


Figura 2

**BIOSENSOR PARA DETECÇÃO DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV-16),
PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSENSOR E KIT DE DETECÇÃO PARA
HPV-16**

Campo da invenção:

[1] A presente invenção refere-se a um biossensor para detecção de papilomavírus humano (HPV-16) através da variação de impedância elétrica, formado por um eletrodo interdigitado, uma sonda de DNA específica e matriz de sulfato de condroitina e quitosana. A presente invenção refere-se também a um kit de detecção compreendendo o biossensor e a processos de produção do biossensor.

[2] A presente invenção apresentou um desempenho muito superior ao de outros dispositivos similares, com limites de detecção na ordem de picomolar (pM) e ausência de interferentes nos testes de seletividade dos biossensores.

Fundamentos da invenção:

[3] Biossensores são dispositivos analíticos compostos por um elemento de reconhecimento biológico seletivo (enzimas, anticorpos, organelas, células, DNA, etc.) que interage com a molécula alvo, um transdutor que converte o sinal biológico em sinal mensurável (NEWMAN; TURNER, 2005; PICCOLI et al., 2018; TURNER, 2013), e um elemento amplificador de sinal seguido de processamento dos dados. Seu princípio de funcionamento baseia-se na interação entre a camada ativa e o analito, que pode ser medida a partir de diferentes técnicas de detecção, incluindo eletroquímicas (SAXENA; DAS, 2016), elétricas (impedância elétrica) (SOARES et al., 2015a, 2015b), gravimétricas (AFONSO et al., 2013) e ópticas (WANG; WOLFBEIS, 2016).

[4] A base da construção destes dispositivos

analíticos foi estabelecida nas primeiras décadas do século XX nos trabalhos de Irving Langmuir e Katherine Blodgett (BLODGETT, 1935; LANGMUIR, 1917), com a busca pelo controle de propriedades de superfície através da imobilização de biomoléculas em substratos sólidos. Essa imobilização era realizada por adsorção física no substrato, que tem a desvantagem da pouca estabilidade do recobrimento. Como a técnica requer vários passos para a adsorção, novas metodologias mais simples foram criadas. Na década de 1980, Sagiv e colaboradores (SAGIV, 1980) desenvolveram métodos de imobilização de biomoléculas por adsorção química. Nessa técnica, denominada automontagem por adsorção química (SAM), moléculas bifuncionalizadas de cadeias longas interagem covalentemente com os grupos químicos do substrato sólido, formando uma camada altamente organizada e orientada devido às interações de van der Waals (SAGIV, 1980). A organização molecular pode melhorar a sensibilidade e seletividade dos biossensores e reduzir a acumulação de espécies indesejadas nos eletrodos. Nos anos 1990, Decher e colaboradores apresentaram um aperfeiçoamento da técnica SAM, chamada *Layer-by-Layer* (LbL), em que as moléculas interagem eletrostaticamente entre si, formando uma matriz homogênea sobre os eletrodos (DECHER; HONG; SCHMITT, 1992; DECHER; SCHLENOFF, 2012; LVOV; DECHER; MOEHWALD, 1993). As principais vantagens do LbL são sua versatilidade e simplicidade, por não requerer instrumentação sofisticada. Além disso, as condições de fabricação dos filmes são brandas, auxiliando na preservação da estrutura e na atividade das biomoléculas, e há grande flexibilidade na escolha das biomoléculas. Com a técnica LbL, pode-se buscar

sinergia entre os materiais que compõem o biossensor, o que melhora sua resposta.

[5] O primeiro biossensor registrado na literatura foi desenvolvido por Clark e Lyons em 1962 (CLARK; LYONS, 1962). É um dispositivo catalítico que detecta o consumo de oxigênio sob altos potenciais de redução com eletrodos de Pt funcionalizados com glicose oxidase. Observou-se que a concentração de oxigênio era proporcional à concentração de glicose. Em 1975 foi apresentada a detecção amperométrica de H_2O_2 para quantificar a concentração de glicose em amostras clínicas (YOO; LEE, 2010).

[6] Devido à versatilidade dos biossensores e o crescente registro de novos casos de infecção por HPV, pesquisadores vêm desenvolvendo dispositivos analíticos bastante sensíveis, que detectam rastros de biomarcadores ou moléculas de DNA de HPV em amostras de fluidos corporais e tecidos. O objetivo principal é produzir biossensores que permitam análise a um custo menor do que os testes comerciais existentes na rede de saúde. Os biossensores de DNA têm vantagens, como baixo custo, detecção rápida, maior sensibilidade devido à amplificação de sinal e possível produção em grande escala (RASOULI et al., 2018). Este tipo de sensor funciona com a hibridização da sonda com a cadeia complementar, gerando um sinal mensurável por um transdutor, que pode ser elétrico, eletroquímico, óptico ou gravimétrico.

[7] Em 2008, Liepold (LIEPOLD et al., 2008) usou arranjos de microeletrodos do tipo Dipstick, consistindo de 32 microeletrodos de ouro em silício, funcionalizados com o DNA da sonda de HPV-6 para detectar a hibridização com a

sonda-alvo, obtendo um limite de detecção de 30pM. Em outro estudo, Dai Tran e colegas (TRAN et al., 2011) depositaram matrizes de polianilina (PAni)/nanotubo de carbono (MWCNT) em eletrodos interdigitados de platina para detectar o vírus HPV, obtendo um limite de detecção de 490 pM. Civit e colaboradores desenvolveram em 2012 (CIVIT et al., 2012) um biossensor eletroquímico para detecção simultânea de HPV-16, 18 e 45, usando um arranjo de eletrodos de Au funcionalizados com as sondas dos respectivos HPV's, alcançando um limite de detecção entre 220 e 170 pM. Em 2013 Wang et al (WANG et al., 2013) construíram um dispositivo eletroquímico composto por nanopartículas de Au em matrizes de nanotubo de carbono de parede simples (SWCNTs) depositados sobre substrato de silício, alcançando um limite de detecção extremamente baixo (0,00001 pM). Huang e co-autores (HUANG et al., 2015) usaram um sensor com matriz de grafeno/nanobastões de Au/politionina para detectar o HPV com limite de detecção de 0,04 pM.

[8] Em 2014, Souza e colaboradores (SOUZA, 2014) construíram um sensor eletroquímico para detectar o marcador E1 HPV16 usando eletrodos de grafite e azul de metileno. O dispositivo apresentou sensibilidade suficiente para detectar rastros do biomarcador com limite de detecção de 1490pM. No mesmo ano, Jampassa et al (JAMPASA et al., 2014) fabricaram um dispositivo eletroquímico com sonda de ácido nucleico de peptídeo pirrolidinil marcado com antraquinona imobilizada (acpcPNA) para detectar o papilomavírus humano (HPV) tipo 16. A sonda foi imobilizada num eletrodo de carbono impresso modificado com quitosana através do carbono terminal de resíduos de lisina, e glutaraldeído como agente

de reticulação. Foi utilizada a técnica da análise voltamétrica de onda quadrada e o limite de detecção foi 4000 pM.

[9] Shariati et al desenvolveram um biossensor para detecção do papilomavírus humano (HPV) em nanotubos de ouro (AuNTs), tendo a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) como princípio de detecção (SHARIATI et al., 2018). Foram usados AuNTs com policarbonato nanoporoso (AuNTs-PC) como eletrodo, e o biossensor foi fabricado pelo método de eletrodeposição. A sonda de DNA de cadeia simples (SS-DNA) foi imobilizada covalentemente no eletrodo AuNTs-PC. O biossensor de DNA fabricado sob amplificação de campo elétrico foi estável até seis semanas e demonstrou 97% de suas respostas iniciais de detecção. O biossensor permitiu detecção da hibridização do DNA do HPV em concentrações nas faixas de resposta linear de 0,01 pM - 1 µM, com limite de detecção de 1fM.

[10] No trabalho que deu origem a esta patente (SOARES et al., 2018), um biossensor microfluídico foi desenvolvido a partir de uma matriz polimérica de quitosana/sulfato de condroitina para detecção de sequências de HPV tipo 16 em amostras comerciais e amostras de células de paciente. Esse dispositivo apresenta vantagem de ser o primeiro sensor que detecta o HPV com transdução do sinal de impedância elétrica. Tal técnica possui vantagens em relação aos biossensores eletroquímicos, incluindo a possibilidade de miniaturização do sistema, a não obrigatoriedade de uso de eletrodos de referência e contra-eletrodos, além da diminuição do volume de amostra utilizado, o que permite a miniaturização do dispositivo. Os autores obtiveram um dispositivo de baixo

custo, que detecta sequências de DNA do HPV tipo 16 em apenas 10 minutos, com limite de detecção abaixo de muitos dispositivos apresentados na literatura (10,5pM).

[11] A tabela 1 apresenta um resumo dos dispositivos para detecção de HPV e suas características.

Tipo de Eletrodo	Limite de Detecção (pM)	Tipo de Transdução	Ref.
Microeletrodos tipo Dipstick funcionalizados com sonda HPV-6	30	Eletroquímica	(LIEPOLD et al., 2008)
Eletrodo Interdigitado de Platina recoberto com PANi-MWCNT	490	Eletroquímica	(TRAN et al., 2011)
Eletrodos de Au funcionalizados com sondas HPV16, 18 e 45	220 e 170	Eletroquímica	(CIVIT et al., 2012)
Nanopartículas de Au em matrizes SWCNTs sobre substrato de silício	0,00001	Eletroquímica	(WANG et al., 2013)
Grafeno/nanobastões de Au/politionina	0,04	Eletroquímica	(HUANG et al., 2015)
Eletrodos de Grafite/Azul de Metileno	1490	Eletroquímica	(SOUZA, 2014)
Eletrodos impressos de carbono/quitosana	4000	Eletroquímica	(JAMPASA et al., 2014)
AuNTs com policarbonato nanoporoso	0,001	Eletroquímica	(SHARIATI et al., 2018)
Eletrodos Microfluidicos Interdigitados de Au recoberto com quitosana/sulfato de condroitina	10,5	Elétrica	(SOARES et al., 2018)

Tabela 1: Dispositivos Elétricos e Eletroquímicos relatados na literatura para detecção do papilomavírus humano.

Estado da técnica:

[12] Alguns documentos do estado da técnica descrevem o desenvolvimento de biossensores, tais como:

[13] O documento AU2003200718 "Nucleic acid ligand diagnostic biochip" descreve o desenvolvimento de um biochip para detecção de uma mistura de oligonucleotídeos diversos

(método SELEX), não relacionados com o HPV. A construção do diagnóstico utiliza o princípio da hibridização sonda-alvo em biochips formados por uma matriz 4x4, no qual o ácido nucleico é ligado ao suporte sólido. Os ácidos nucleicos imobilizados no suporte sólido, por sua vez, são selecionados sem saber o alvo molecular a que se ligam, o que pode levar à presença de falsos positivos devido às interações não específicas. A hibridização sonda-alvo induz a mudança da fluorescência da solução, que pode ser detectada por um analisador de fluorescência ou por ressonância de plásmons de superfície (SPR).

[14] O método descrito no documento AU2003200718 não mostra similaridades com a presente invenção, já que nesta foram desenvolvidos biossensores elétricos, compostos por eletrodos interdigitados de Au, que são funcionalizados com filmes nanoestruturados de materiais de fontes naturais/renováveis para detecção de sequências específicas de DNA de HPV16. Devido à organização molecular gerada pelos filmes nanoestruturados, a interação da sequência complementar de HPV16, de apenas 17 bases nitrogenadas, (5'-CTGTCCGGTTCTGCTTG-3') com uma sonda (5'-[NH₂-C₆]-CAAGCAGAACCGGACAG-3') imobilizada na nanoestrutura polimérica, gera mudanças do comportamento da capacitância na região de dupla camada elétrica, gerando sensores que detectam rastros do HPV-16 em amostras de pacientes e amostras de células, na ordem de pM (pico molar).

[15] Além disso, a versatilidade e a simplicidade dos biossensores da presente invenção permitem sua miniaturização e conseqüentemente a sua implantação para rastreamento do HPV-16 em tempo real, o que não ocorre com o

dispositivo relatado em AU2003200718. A presente invenção possibilita realizar o diagnóstico com baixo custo e curto período de tempo (em até 10min), o que não é possível com a metodologia do documento AU2003200718.

[16] O documento PI11060620 "Biossensor eletroquímico para detecção específica de papilomavírus humano" ilustra a construção de um biossensor eletroquímico para detecção de HPV cervical a partir de impedância eletroquímica. A transdução eletroquímica é uma forma mais complexa para se detectar analitos de interesse em relação à impedância elétrica (que é a matéria da presente invenção), já que a mesma se utiliza de um aparato composto por um chip com 3 eletrodos (contra eletrodo, eletrodo de trabalho e eletrodo de referência). No caso do documento PI11060620, os autores utilizam um arranjo com 10 diferentes eletrodos de trabalho, 10 diferentes eletrodos de referência e 10 contra-eletrodos, interligados entre si, num sistema multifitas.

[17] Diferentemente do documento PI11060620, o método de transdução utilizado na presente invenção (impedância elétrica) utiliza-se de um chip composto por apenas um eletrodo de trabalho, sem a necessidade de eletrodos de referência e contra eletrodos, na qual a solução trabalho é gotejada em volumes muito pequenos (da ordem de μL), sendo, portanto, um método mais simplificado e rápido, conferindo miniaturização do dispositivo.

[18] Os autores do documento PI11060620 construíram um dispositivo eletroquímico para detecção de 28 tipos de HPV a partir de sondas com 55 bases nitrogenadas, imobilizadas no arranjo de 10 eletrodos (multifitas), que usam indicadores colorimétricos para indicação da hibridização sonda-alvo.

Este tipo de arquitetura do dispositivo, apresentado pelos autores do documento PI11060620, não garante a especificidade do mesmo, já que cada sequência de DNA é correspondente a apenas um tipo específico de HPV, podendo haver alto risco de falsos positivos. Isto pode ser observado quando se detectam os HPVs 16 e 31, que diferem de apenas 1 base nitrogenada. O exame de captura híbrida se utiliza deste conceito para fazer os diagnósticos. No caso do documento PI11060620, o biossensor não é específico para cada HPV, os autores não provam com resultados qual tipo de HPV foi detectado a partir do sinal eletroquímico, apenas citam. O limite de detecção não é citado pelo documento, além de como foi feita essa curva de calibração durante a detecção, não demonstrando realmente se esses HPVs foram detectados e diferenciados.

[19] Diferentemente do documento PI11060620, a presente invenção utiliza uma sonda de sequência exclusiva para o HPV 16 de cabeça e pescoço, com apenas 17 bases nitrogenadas (5'- [NH₂-C6]-CAAGCAGAACCGGACAG-3'), onde se detecta com eficácia a sequência de DNA correspondente ao HPV 16 de cabeça e pescoço (5'- CTGTCCGGTTCTGCTTG-3') em até 10min. Estas sondas são imobilizadas em matrizes poliméricas de origem natural, o que confere biocompatibilidade aos mesmos, permitindo portabilidade destes biossensores para dispositivos implantáveis de baixo custo, que façam a leitura em tempo real, o que não se observa nos sensores do documento PI11060620. Em suma, o método da presente invenção é específico, com limite de detecção de 10,5 pM, e com testes de validação realizados com diferentes linhagens celulares, dentre as quais CasKi, SiHa, UM-SCC47, UM-SCC104, 93-VU147,

JHU12, JHU13 e JHU28).

[20] O documento Karimizefreh, P. Sasanpour, E. Jokar, R. Mohammadpour, M. Vaezjalali, T. Tekieh, "Human Papilloma Virus biosensor based on electrochemical impedance spectroscopy of DNA hybridization", 2014 IEEE 34th Int. Sci. Conf. Electron. Nanotechnol., pp. 368-370, Apr. 2014 (Karimizefreh) aborda a construção de um biossensor para detecção do HPV16, usando como base a impedância eletroquímica em eletrodos de ouro. Estes eletrodos foram modificados com uma sonda de comprimento 25-mer, quimicamente modificada com tiol para interação das cadeias da mesma com os átomos de Au da superfície.

[21] Os autores não demonstraram o limite de detecção do sensor (consequentemente não apresentaram curva de calibração), não caracterizaram a superfície dos eletrodos modificados antes e após a hibridização, não realizaram testes de falsos positivos e nem fizeram a prova de conceito do dispositivo utilizando amostras reais (de células, por exemplo). Diferentemente do Documento Karimizefreh, o sensor proposto na presente invenção utiliza eletrodos interdigitados de Au que apresentam área de contato maior em relação aos eletrodos comuns, o que os tornam mais sensíveis. Tais dispositivos não necessitam de eletrodos de referência nem contra-eletrodos, apresentando uma montagem muito mais rápida e simplificada, conferindo miniaturização ao dispositivo final.

[22] Nestes eletrodos interdigitados de Au, uma sequência de DNA curta de HPV16, de apenas 17 bases nitrogenadas (5'-CTGTCCGGTTCTGCTTG-3'), se liga especificamente a uma sonda complementar (5'-[NH₂-C₆]-

CAAGCAGAACCGGACAG-3'), immobilizada em um filme polimérico nanoestruturado ultrafino para a hibridização das cadeias sonda-alvo. Tal sonda é modificada quimicamente com grupos amina para que a mesma interaja com matrizes que contenham o grupo ácido carboxílico em sua estrutura. Como prova de conceito da presente invenção, essas matrizes foram construídas com materiais de fontes naturais/renováveis, que apresentam biocompatibilidade e permitem a construção de biossensores de baixo custo, que possam ser implantáveis para diagnóstico em tempo real.

[23] Além disso, o trabalho desenvolvido na presente invenção gerou uma prova de conceito completa dos biossensores, com limite de detecção de 10,5pM, caracterização completa das nanoestruturas e medidas em amostras reais de células com controle positivo e negativo de HPV16.

[24] O documento Karimizefreh, A., Mahyari, F. A., VaezJalali, M., Mohammadpour, R., & Sasanpour, P. (2017). Impedimetric biosensor for the DNA of the human papilloma virus based on the use of gold nanosheets. *Microchimica Acta*, 184(6), 1729-1737 (*Microchimica*), assim como os documentos anteriores, refere-se a um biossensor para detecção do HPV16 cervical a partir da Espectroscopia de Impedância Eletroquímica realizada em eletrodos de carbono vítreo modificados com nanofolhas de Au. Os autores do trabalho mencionado funcionalizaram a superfície dos eletrodos com uma sonda de DNA HPV16 (5'-SH-AAAGCAAAGTCATATACCTCACGTC-3'), modificadas com grupo tiol, para detecção da sequência complementar 5'-GACGTGAGGTATATGACTTTGCTTT-3'. Os biossensores apresentaram baixos limite de detecção de

0,15pM, sem a presença de falsos positivos (que foram avaliados por medidas de impedância eletroquímica de duas sequências não complementares (5'-TTGCAAGACAGTATTGGAACCTTACA-3' e 5'-AACGTGAGGTATATGACTTTGCTTT-3')).

[25] Já a matéria da presente invenção aborda um biossensor não-eletroquímico para detecção de HPV-16 a partir de medidas de impedância elétrica em eletrodos interdigitados de Au, modificados com sondas de bases nitrogenadas para detecção do HPV16. A escolha por um sensor elétrico (não-eletroquímico) traz vantagens na sua construção devido à simplicidade do método, já que não há necessidade de eletrodos de referência e contra-eletrodos, o que os torna de fácil e rápida construção. Devido à sua versatilidade, o dispositivo demonstrado na presente invenção apresenta portabilidade para impedância eletroquímica.

[26] Além destas vantagens, a matéria desta patente usa filmes nanoestruturados à base de polímeros de fontes naturais/renováveis, que são depositados sobre os eletrodos para imobilização da sonda 5'-[NH₂-C₆]-CAAGCAGAACCGGACAG-3'. Esta sonda tem apenas 17 bases nitrogenadas, o que torna o sensor mais vantajoso em termos de simplicidade para detecção da sequência complementar de HPV16 (5'-CTGTCCGGTTCTGCTTG-3'), já que uma sequência de DNA de menor comprimento pode se organizar de maneira mais eficaz nos filmes devido à repulsão eletrostática gerada pelas próprias cadeias do DNA. O uso desses tipos de materiais é importante, pois permite construir biossensores de baixo custo que possam ser implantáveis para diagnóstico em tempo real.

[27] As matrizes apresentam elevada biocompatibilidade,

o que não se observa nos trabalhos citados. Apesar de o biossensor da presente invenção apresentar limite de detecção maior (10,5 pM) do que o sensor do documento *Microchimica*, o sensor da presente invenção apresenta sensibilidade suficiente para detectar rastros de sequência de HPV-16 em amostras de células e de fluido corporal, como evidenciado na prova de conceito realizada, detectando diferentes linhagens celulares, dentre elas as que continham a sequência de trabalho (CasKi, SiHa, UM-SCC47, UM-SCC104, 93-VU147T) e linhagens de controle (JHU12, JHU13, e JHU28).

[28] No documento WO2008051316 "*NANOSENSORS AND RELATED TECHNOLOGIES*", os autores foram minuciosos e reivindicaram a possibilidade de usar os biossensores com muitas técnicas de detecção e uma grande variedade de materiais para compor os biossensores. Entretanto, há dois pontos cruciais que não estão cobertos no WO2008051316. O primeiro é que a presente invenção emprega eletrodos interdigitados, sem necessidade de eletrodos de referência, o que simplifica o dispositivo sensor, e permite miniaturização. O segundo aspecto está relacionado à camada ativa do biossensor objeto da presente invenção, que contém uma sequência de DNA com apenas 17 bases. Como mencionado em outros pontos, além de ser mais simples obter um biossensor com essa sequência, há possibilidade de alta sensibilidade porque os filmes nanoestruturados apresentam maior organização molecular com essa sequência menor.

[29] O documento Mahmoodi, P., Fani, M., Rezayi, M., Avan, A., Pasdar, Z., Karimi, E., Amiri, I. S. and Ghayour-Mobarhan, M. (2019), Early detection of cervical cancer based on high-risk HPV DNA-based genosensors: A systematic review.

BioFactors, 45: 101-117 (Mahmoodi) aborda diferentes tipos de biossensores para detecção do HPV16 e HPV18.

[30] Nos trabalhos relatados pelo autor, são usados sensores ópticos, piezoelétricos, eletrogravimétricos, magnéticos e, principalmente biossensores eletroquímicos (sobretudo os trabalhos de Wang et al) para detecção de sequências do HPV16 e 18. Contudo, em nenhum trabalho citado foi utilizada a impedância elétrica como técnica de detecção. Este tipo de transdução é mais simples do que as demais, principalmente comparando-se com a impedância eletroquímica, pois a técnica com impedância elétrica não requer 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 tem a vantagem de usar tanto a impedância elétrica quanto a impedância eletroquímica como transdutor.

[31] Além de o tipo de transdução/eletrodo e de filme nanoestruturado da presente invenção ser de baixo custo, permitir miniaturização, e possibilidade de implante para detecção em tempo real, outro avanço científico está na sequência de DNA utilizada. A sequência usada na presente invenção (CTGTCCGGTTCTGCTTG) foi criada a partir de estudos realizados pelos colaboradores do Hospital de Câncer de Barretos no diagnóstico de HPV16 sem uso de sensores. Parte desta sequência é observada apenas na referência 37, como sendo componente de uma sequência de 24 bases nitrogenadas de maior comprimento. A sequência utilizada na presente invenção para detectar o HPV-16 apresenta número menor de bases nitrogenadas do que a maioria dos trabalhos citados (17 bases nitrogenadas), o que pode ser vantajoso devido à

melhor organização molecular dos filmes nanoestruturados nestas condições.

[32] O invento descrito pelo documento US7470533 "*Impedancebased devices and methods for use in assays*" foca, de modo geral, na construção genérica de eletrodos impedimétricos para detecção de células e moléculas em geral, através da alteração na impedância medida nos eletrodos, a partir dos quais a presença, comportamento, quantidade ou alteração de células ou moléculas em uma solução de amostra pode ser identificada. No documento citado, o autor mostra como são fabricados os eletrodos a partir da técnica de fotolitografia comum. Esta técnica permite que o eletrodo possa ser impresso em diferentes superfícies, dentre elas vidro, polímeros e outros materiais.

[33] O US7470533 é um documento genérico, não específico para detecção de qualquer tipo de HPV. São mencionados diferentes tipos de eletrodos impedimétricos para detectar polipeptídeos, DNA e células. Apesar do uso de eletrodos interdigitados como base das unidades sensoriais, o US7470533 emprega a modificação das superfícies de ouro com a própria molécula da camada ativa para detecção das biomoléculas alvo. De fato, este tipo de modificação é amplamente usado na literatura, mas há desvantagens consideráveis. A mais importante delas é que a camada ativa pode não ser adsorvida de maneira a preservar a atividade das biomoléculas.

[34] Por outro lado, a presente invenção utiliza eletrodos interdigitados e microfluídicos que são modificados com materiais de fontes naturais/renováveis de baixíssimo custo, que apresentam biocompatibilidade e

biodegradabilidade. O uso desses filmes nanoestruturados na estrutura do sensor auxilia principalmente na preservação da atividade da camada ativa imobilizada, melhorando o desempenho do biossensor e conseqüentemente a relação sinal/ruído.

[35] Ainda na comparação com o que é proposto em US7470533, os eletrodos que podem ser usados na presente invenção possuem área ativa menor que 1 mm², muito menor do que os eletrodos utilizados em US7470533 (Tabela 1, página 95). Uma área menor implica na possibilidade de se empregar volume de amostra menor nas medidas de detecção, o que é crucial em biossensoriamento. Além disso, com eletrodos menores pode-se mais facilmente atingir miniaturização dos dispositivos sensores. Outro avanço científico da presente invenção, em comparação com US7470533, está no uso da sequência de DNA para detecção de HPV. Em US7470533 há apenas uma sequência genérica como prova de conceito para demonstrar que os eletrodos são suficientemente sensíveis para mostrar a mudança do sinal elétrico. Na presente invenção, por outro lado, é empregada uma sequência com apenas 17 bases nitrogenadas (CTGTCCGGTTCTGCTTG). Isso permite atingir alta sensibilidade e especificidade nos biossensores relatados na presente invenção, uma vez que o comprimento da sequência influencia a organização das moléculas da camada ativa. De fato, sequências de bases de menor comprimento possuem vantagens, pois as interações de Van der Waals entre as cadeias geram organização molecular da camada ativa.

[36] O documento EP2273263 "METHOD FOR ELECTRICALLY DETECTING PHYSIOLOGICALLY ACTIVE MATERIALS AND BIOCHIP FOR THE SAME" apresenta um método geral de detecção de

nucleotídeos que difere do método utilizado na presente invenção. No documento afirma-se que monitorar a capacitância de um eletrodo de biossensor durante a hibridização entre a sonda e sua cadeia complementar não serve para biossensoriamento, por falta de sensibilidade. Relata-se, por outro lado, que mudanças de propriedade elétrica, especialmente modificações de impedância ou capacitância, podem ser medidas após uma reação biológica, bioquímica ou química. A ênfase do documento EP2273263 é no biochip e método de detecção, de forma genérica, sem apresentar a possibilidade de detecção de DNA de HPV.

[37] O diferencial da presente invenção em relação a EP2273263 está na otimização da arquitetura molecular do biossensor, que permitiu detecção de DNA como resultado de hibridização de DNAs de HPV-16, algo que o documento EP2273263B1 afirmava não ser possível. De fato, o método descrito na presente invenção apresenta sensibilidade alta, sendo possível detectar alteração nos valores de impedância e capacitância. O sensor descrito na presente invenção é formado por eletrodos interdigitados e microfluídicos modificados com nanomateriais de fontes renováveis, biocompatíveis e biodegradáveis, que permite a implantação do sensor para detecção em tempo real. Esses materiais auxiliam principalmente na preservação da atividade da camada ativa imobilizada, melhorando o desempenho do biossensor e conseqüentemente a relação sinal/ruído.

[38] No documento EP2273263, não há menção ao uso de materiais nanoestruturados, o que também representa uma diferença fundamental para a abordagem adotada na presente invenção.

[39] Portanto, diferente do estado da técnica, a presente invenção refere-se a um biossensor para detecção do papilomavírus humano (HPV-16) e seu processo de produção, além de kit contendo o referido biossensor, através da variação da impedância elétrica, formado por um eletrodo interdigitado, uma sonda de DNA específica e matriz de sulfato de condroitina e quitosana.

Breve descrição da invenção:

[40] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece um biossensor capaz de detectar HPV-16 em amostras.

[41] É um objeto da presente invenção um biossensor capaz de detectar HPV-16 em amostras, compreendendo um eletrodo interdigitado revestido com pelo menos uma bicamada de filmes nanoestruturados, em que a bicamada de filmes nanoestruturados é composta de uma camada de um polissacarídeo contendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina e uma camada de um glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico, e uma sonda específica para a detecção de HPV16, onde a sonda é um polinucleotídeo composto de um grupo 5-NH₂-C₆.

[42] Em uma modalidade preferencial, o polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina é a quitosana e o glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico é o sulfato de condroitina.

[43] É um adicional objeto da presente invenção um kit de detecção compreendendo o biossensor. Em uma modalidade preferencial, o kit de detecção compreende:

- a) O biossensor; e
- b) Meios para solubilização da amostra.

[44] O kit compreende ainda instruções de como preparar a amostra, realizar a medição e interpretar os resultados.

[45] É um objeto adicional da presente invenção um processo de fabricação do biossensor. Em uma modalidade preferencial, o processo de fabricação do biossensor compreende as etapas de:

- a) Injeção de uma solução de 0,5 a 2,0 mg/ml de um polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina, a um pH na faixa de 4 a 5, no microcanal do chip microfluídico;
- b) Injeção de uma solução de 0,5 a 2,0 mg/ml de um glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico, a um pH na faixa de 4 a 5, no microcanal do chip microfluídico;
- c) Injeção de uma solução mista de 0,05M a 0,5M de N-hidroxissuccinimida (NHS)/ 0,05M a 0,5M de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) no microcanal do chip microfluídico; e
- d) Injeção da sonda específica para a detecção de HPV-16.

[46] Em uma modalidade preferencial, o processo compreende uma etapa de lavagem para remoção de material não-ligado após cada etapa de injeção. Em uma outra modalidade preferencial, as etapas a) e b) são repetidas antes da etapa c), de modo a criar novas bicamadas sobre o eletrodo.

Breve descrição das figuras:

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

[48] A figura 1 mostra o Chip microfluídico composto por eletrodo interdigitado impresso em substrato rígido/flexível e microcanais construídos em PDMS para injeção de amostras de interesse.

[49] A figura 2 mostra a representação esquemática da funcionalização do eletrodo e detecção de HPV-16 sob fluxo contínuo.

[50] A figura 3 mostra amassa calculada com a Equação de Sauerbrey medida com uma microbalança de cristal de quartzo para a deposição de monocamadas de quitosana e sulfato de condroitina na superfície de um cristal.

[51] A figura 4 mostra os Espectros PM-IRRAS para superfícies de ouro (Au) modificadas com filmes LbL de quitosana e sulfato de condroitina. Quando a quitosana está na camada superior, o filme foi referido como 0,5, 1,5, 2,5 e 3,5 bicamadas (no gráfico superior). Para o sulfato de condroitina no topo, os filmes tinham 1, 2, 3 e 4 bicamadas (parte inferior da figura).

[52] A figura 5 mostra o espectro de capacitância para biossensores imersos em solução de PBS com diferentes concentrações de controle positivo de ssHPV16 nas temperaturas de hibridização de (A) 22 °C e (B) 55°C. São representadas as curvas de calibração modeladas a partir de um modelo de Freundlich.

[53] A figura 6 mostra o IDMAP obtido dos dados de capacitância x frequência para amostras comerciais do HPV16+ e 7 amostras de linhagens celulares do Hospital de Câncer de Barretos. Na projeção observa-se a formação de 2 clusters, nos quais as amostras negativas estão localizadas à esquerda (linha vermelha) e as amostras positivas à direita da

projeção (linha verde).

Descrição detalhada da invenção:

[54] A presente invenção descreve o desenvolvimento de um biossensor elétrico para detectar uma sequência de papilomavírus humano ou HPV-16 (ssHPV16) em amostras de pacientes acometidos pelo câncer de cabeça e pescoço, empregando camadas múltiplas de materiais para construção de uma matriz extremamente fina e homogênea. Nessa matriz é ancorada a camada ativa, permitindo obter biossensores de baixo custo e melhor desempenho do que os dispositivos fabricados anteriormente. Algumas das vantagens dos biossensores desenvolvidos em relação aos métodos de detecção já disponíveis são: i) rápida detecção do HPV-16 a partir do DNA do vírus do HPV-16, que pode aumentar as chances de cura e a sobrevivência do paciente acometido com câncer de cabeça e pescoço; ii) rápida construção da unidade sensorial com materiais de fontes renováveis, com possibilidade de produção em larga escala e excelente reprodutibilidade; iii) miniaturização do sistema que permite sua aplicação em consultórios particulares e hospitais, além do baixo custo de produção da unidade sensorial.

[55] A detecção através do material genético permite o rastreamento do HPV-16 em amostras de fluidos corporais, tais como sangue, suor e saliva, e conseqüentemente, a predisposição para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. Para tal, uma nova sonda de DNA, sintetizada por Arantes e colaboradores (ARANTES et al., 2015), é construída por Reação em Cadeia da polimerase (PCR) a partir de três sequências de DNA em conjunto, sendo duas delas primers para

a DNA polimerase. A terceira sequência, chamada de sonda, é modificada com um grupo 5' NH₂-C₆ que liga covalentemente ao filme depositado sobre os eletrodos, formando uma nanoestrutura estável que preserva a atividade das biomoléculas e permite detectar rastros do vírus do HPV (tipo 16) utilizando métodos eletroquímicos e impedanciométricos.

[56] O biossensor da presente invenção é definido como um biossensor capaz de detectar papilomavírus humano (HPV-16) em amostras compreendendo um eletrodo interdigitado revestido com pelo menos uma bicamada de filmes nanoestruturados, onde a bicamada de filmes nanoestruturados é composta de uma camada de um polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina e uma camada de um glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico, e uma sonda específica para a detecção de HPV16, onde a sonda é um polinucleotídeo compreendendo um grupo 5-NH₂-C₆.

[57] Preferencialmente, o polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina é a quitina ou quitosana. Mais preferencialmente, o polissacarídeo é a quitosana. Preferencialmente, o glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico é o sulfato de condroitina. Preferencialmente, a sonda específica para a detecção de HPV-16 é uma sequência de DNA [NH₂-C₆] CAAGCAGAACCGGACAG (SEQ ID. NO. 1).

[58] A camada de polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina está em contato com o eletrodo interdigitado e com a camada de glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico.

[59] A camada de glicosaminoglicano compreendendo

unidades de ácido urônico está em contato com a camada de polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina e com a sonda específica para a detecção de HPV16.

[60] A sonda específica para a detecção de HPV-16 é um polinucleotídeo de acordo com a sequência [NH₂-C₆] CAAGCAGAACCGGACAG.

[61] A matriz polimérica de quitosana/sulfato de condroitina foi inicialmente caracterizada por medidas de microbalança de cristal de quartzo (MCQ) para avaliação da massa de polímeros adsorvida por unidade de área e o tempo de adsorção dos mesmos. A mesma matriz também foi avaliada por medidas de Espectroscopia de Infravermelho por Reflexão e Absorção com Polarização Modulada (PM-IRRAS), que avaliou mudanças na orientação dos dipolos moleculares com o processo de adsorção e com a interação sonda-sequência complementar, além de corroborar os resultados de MCQ.

[62] Adicionalmente a presente invenção apresenta um kit, de modo a facilitar sua distribuição e uso. O kit compreende:

- a) O biossensor; e
- b) Meios para solubilização da amostra.

[63] O kit compreende ainda instruções de como preparar a amostra, realizar a medição e interpretar os resultados.

[64] Adicionalmente a presente invenção apresenta também um processo de fabricação do biossensor, que compreende as etapas de deposição de camadas alternadas de um polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina e de um glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico sobre o suporte do

eletrodo interdigitado.

[65] O eletrodo interdigitado sempre estará em contato com a camada de polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina e a sonda sempre estará em contato com a camada de glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico.

[66] Especificamente, o processo de fabricação do biossensor compreende as etapas de:

- a) Injeção de uma solução de 0,5 a 2,0 mg/ml de um polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina, a um pH na faixa de 4 a 5, no microcanal do chip microfluídico;
- b) Injeção de uma solução de 0,5 a 2,0 mg/ml de um glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico, a um pH na faixa de 4 a 5, no microcanal do chip microfluídico;
- c) Injeção de uma solução mista de 0,05M a 0,5M de N-hidroxissuccinimida (NHS)/ 0,05M a 0,5M de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) no microcanal do chip microfluídico; e
- d) Injeção da sonda específica para a detecção de papilomavírus (HPV-16).

[67] Em uma modalidade preferencial, o processo compreende uma etapa de lavagem para remoção de material não-ligado após cada etapa de injeção.

[68] Em uma outra modalidade preferencial, as etapas a) e b) são repetidas antes da etapa c), de modo a criar novas bicamadas sobre o eletrodo.

[69] Preferencialmente, o tampão é um tampão acetato de pH 4,5.

Exemplos

[70] A invenção propõe a construção de um biossensor para detectar HPV16+ em amostras provindas de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, a partir de dispositivos fabricados com filmes nanoestruturados de quitosana e sulfato de condroitina. Esses filmes foram adsorvidos em eletrodos interdigitados através da técnica de microfluídica e funcionalizados com sondas de HPV16+. Inicialmente, a superfície dos biossensores foi caracterizada por técnicas que comprovam a modificação do eletrodo, como a microbalança de cristal de quartzo, a espectroscopia infravermelha com modulação de polarização (PM-IRRAS) e medidas do ângulo de contato.

[71] Durante a detecção, a espectroscopia de Impedância Elétrica (IE) foi utilizada para construção das curvas de calibração do sensor, com limite de detecção de 10,5pM, e estudo dos processos de adsorção utilizando modelo de Freundlich. Além da detecção, as análises da seletividade dos biossensores foram realizadas com mapas de visualização (IDMAP) de informações que permitiram classificar as amostras de pacientes do Hospital de Câncer de Barretos.

[72] A combinação de técnicas de caracterização e detecção permite a identificação das propriedades dos dispositivos, com o objetivo de otimizar seu desempenho, a sensibilidade e seletividade, visando à aplicação médica no Sistema Único de Saúde, com o objetivo de facilitar o diagnóstico em curto período de tempo.

Exemplo 1 - Obtenção dos Chips Microfluídicos

[73] Os eletrodos interdigitados microfluídicos foram fabricados por fotolitografia convencional, no qual lâminas

de vidro BK7 receberam um tratamento químico inicial com hexametil-disiloxano (HMDS) e fotorresiste positivo AZ4210, depositados pela técnica de spin coating. Após este processo, os eletrodos foram confeccionados a partir de máscara litográfica e exposição à luz UV durante 10 s para polimerização do fotorresiste, seguido da revelação dos mesmos com aplicação de hidróxido de tetrabutílamônio e metalização via sputtering, com cromo e ouro. As lâminas metalizadas foram imersas em banho de acetona para remoção do metal depositado sobre o fotorresiste. Terminada esta etapa, os microcanais em PDMS foram construídos a partir de um molde de SU-8. Primeiramente, o PDMS foi preparado a partir do kit 7 Sylgard 184, composto pelo elastômero e um agente de cura, que foram misturados e colocados no molde SU-8, seguido da fixação das mangueiras. Os microcanais de PDMS foram retirados do molde e finalmente selados aos eletrodos interdigitados em câmara de plasma de O₂ com pressão de 0,07 torr e 100 W. A Figura 1 ilustra o chip microfluídico utilizado neste trabalho.

Exemplo 2 - Funcionalização dos Chips Microfluídicos

[74] O biossensor descrito nesta invenção (SOARES et al., 2018) é composto por um chip microfluídico construído a partir de eletrodos de ouro, microcanal de um polímero (PDMS) conectado a mangueiras de PDMS para injeção dos materiais, duas bicamadas poliméricas de quitosana (Mv= 87000 g/mol, grau de desacetilação= 85%)/sulfato de condroitina (Mv= 22000 g/mol) construídas a partir da técnica LbL que possuem a função de matriz para imobilização da camada ativa.

[75] A funcionalização do chip microfluídico com os

filmes nanoestruturados é iniciada por uma limpeza inicial do eletrodo de trabalho no microcanal de PDMS. Para isto, 250µL de uma solução de tampão acetato pH 4,5 são injetados nos eletrodos com taxa de 20µL/min durante 10min, usando uma microsseringa acoplada a uma bomba de fluxo, seguida da lavagem para remoção de traços da solução tampão da superfície dos eletrodos. Tal lavagem é realizada com água ultrapura, injetada nas mesmas condições anteriores:

a) Uma solução de 1mg/ml de quitosana (250µL), diluída em tampão acetato pH 4,5 e à temperatura ambiente, é injetada no microcanal do chip, com fluxo de 20µL/min durante 10min, seguida da lavagem com solução tampão acetato, nas mesmas condições, para remoção de moléculas fracamente adsorvidas.

b) Após a lavagem, uma solução aquosa de 1 mg/mL de sulfato de condroitina é injetada no microcanal sob as mesmas condições da primeira camada de quitosana, com fluxo de 20µL/min durante 10min. O passo da lavagem é executado com água ultrapura nas mesmas condições acima.

[76] Os passos a) e b) descritos acima são repetidos, nas mesmas condições, formando um filme LbL nanoestruturado, de duas bicamadas poliméricas, que apresenta grupos ácidos carboxílicos (-COOH) expostos na camada de sulfato de condroitina. Estes grupos são quimicamente ativados por uma solução mista de 0,1M N-hidroxissuccinimida (NHS)/0,1 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), injetada no microcanal do chip com uma taxa de 8,3 µL/min em temperatura ambiente, durante 30 min, seguida da lavagem com água ultrapura.

[77] Com ativação dos grupos ácidos carboxílicos na

etapa acima, uma ligação covalente estável pode ser estabelecida entre tais grupos da estrutura de sulfato de condroitina e a sonda de DNA cpHPV 16, depositada em seguida com função de camada ativa. Esta sonda, com sequência [NH₂-C₆] CAAGCAGAACCGGACAG, adaptada de Arantes e colaboradores (Arantes et al., 2015), foi injetada nos microcanais dos eletrodos em uma solução aquosa, à temperatura ambiente, com taxa de fluxo de 12,5 µL/min durante 30min, seguida da lavagem com água ultrapura. Foram usados os mesmos parâmetros experimentais anteriores, para remoção de moléculas não adsorvidas.

[78] O trabalho de Arantes e colaboradores utiliza um conjunto de três sequências em uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), na qual duas delas têm a função de primers para a DNA polimerase. A sequência restante, chamada de "sonda", é inicialmente composta por um fluoróforo 5' 6-FAM e um supressor 3' MGB-NFQ. Na presente invenção, a sequência de DNA da sonda descrita por Arantes e colaboradores foi "adaptada" porque tanto o fluoróforo quanto o supressor foram eliminados. Então, um grupo 5' NH₂-C₆ é adicionado à sonda cpHPV16, diferenciando-a da descrita em Arantes e colaboradores. A sonda cpHPV16 é responsável pelo biorreconhecimento do controle positivo do ssDNA HPV16, conforme esquema da Figura 2.

[79] A adsorção das bicamadas foi monitorada por uma microbalança de cristal de quartzo (Figura 3). Quitosana e sulfato de condroitina adsorveram na superfície do cristal dentro de 3 e 2 min, respectivamente, mediante interação eletrostática entre os grupos amino protonados de quitosana (NH₃⁺) e os grupos COO⁻ do sulfato de condroitina. A massa

adsorvida na primeira bicamada foi de 1,38 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de quitosana e 3,71 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de sulfato de condroitina, enquanto a segunda camada de quitosana tinha uma massa consideravelmente maior (2,03 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) devido à primeira camada de sulfato de condroitina que teve um número significativo de cargas negativas (COO^-), em comparação com o cristal puro. A massa da segunda camada de sulfato de condroitina, por outro lado, não foi muito diferente da primeira, sendo 3,86 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Para garantir total deposição, os tempos de adsorção adotados para a fabricação do biossensor foram de 10 minutos para todas as camadas.

[80] A adsorção de camadas quitosana/sulfato de condroitina na superfície de ouro foi confirmada com espectroscopia de Infravermelho por Reflexão e Absorção com Polarização Modulada (PM-IRRAS). Nas condições experimentais utilizadas, as bandas para cima significam que os momentos dipolares associados aos grupos químicos são orientados perpendicularmente à superfície do substrato. A Figura 4 mostra os espectros normalizados de superfícies funcionalizadas com quitosana e quitosana/ sulfato de condroitina (1 a 4 bicamadas), apresentando bandas devido à quitosana a 1570 cm^{-1} (N-H e C-N na amida II) e 1418 cm^{-1} (deformação CH_2) e sulfato de condroitina em 1118 cm^{-1} (alongamento vibracional C-O) e 1655 cm^{-1} (deformação angular de C=O). A intensidade das bandas atribuídas ao sulfato de condroitina aumenta com o número de bicamadas, indicando que os grupos correspondentes têm sua orientação preservada quando da adsorção de outras camadas. Para as bandas relacionadas à quitosana, por outro lado, a intensidade não varia com o número de camadas depositadas provavelmente

porque quanto mais camadas de quitosana são adsorvidas, os grupos químicos responsáveis pelas bandas são reorientados.

Exemplo 3 - Descrição das linhagens de células cancerígenas

[81] As amostras de DNA das linhagens celulares CasKi, SiHa, UM-SCC47, UM-SCC104, 93-VU147T, JHU12, JHU13 e JHU28 foram analisadas usando medições de impedância elétrica com os biossensores fabricados conforme Exemplos 1 e 2 acima. As células foram mantidas em meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) ou RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 2 mM de glutamina, numa incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C. O DNA genômico foi isolado da cultura celular usando o MicroKit DNA QIAamp (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

[82] As linhagens celulares SiHa e CaSki foram adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC). As linhas celulares UM-SCC47 e UM-SCC104 foram adquiridas da Millipore (Cat. # SCC071 e Cat. # SCC072, respectivamente). A linhagem 93-VU147T foi fornecida pela Dra. Josephine Dorsman (VU University Medical Center) enquanto as linhagens do controle negativo JHU12, JHU13, JHU28 foram fornecidos pelo Dr. Joseph Califano (John Hopkins University). As linhagens celulares CasKi e SiHa possuem 600 e 2 cópias de HPV16 por célula, respectivamente, e foram usados como controle positivo. As linhagens celulares JHU12, JHU13 e JHU28 foram confirmadas negativas para o HPV16, enquanto o número de cópias virais obtidas para as linhas celulares HPV+ UMSCC47, UMSCC104 e 93-VU147T foi de 33, 2 e 68 cópias por célula.

Exemplo 4 - Detecção de HPV em uma sequência de oligonucleotídeo comercialmente sintetizada e em célula de câncer de cabeça e pescoço

[83] As medidas de espectroscopia de impedância foram realizadas com um Solartron modelo 1260 A (SolartronAnalytical) no intervalo de 1-10⁶ Hz, com os chips microfluídicos revestidos com filmes LbL como descrito acima. Uma sequência oligonucleotídica sintetizada comercialmente, análoga a uma região do DNA do HPV16, foi usada como controle positivo (ssHPV16). Soluções de ssHPV16 (CTGTCCGGTTCTGCTTG), com concentrações de 0,05, 0,1, 0,6, 1,1, 2,1, 3,1, 4,1, 5,1 e 6,1 nM foram bombeadas no microcanal a 22 e 55 °C durante 10 minutos e vazão de 12,5 µL/min, seguido de lavagem com solução tampão para remoção de moléculas pouco adsorvidas. Após a lavagem, as medidas elétricas foram realizadas com injeção de solução salina tamponada com fosfato (PBS) nos microcanais, com vazão de 12,5 µL/min.

[84] As medidas elétricas das amostras de células cancerígenas foram realizadas após o procedimento a seguir: soluções de linhagens de células cancerígenas (CasKi, SiHa, UM-SCC47, UM-SCC104, 93-VU147T, JHU12, JHU13 e JHU28) foram injetadas no eletrodo microfluídico a 55 °C, seguida de lavagem com solução de PBS para a remoção de moléculas mal adsorvidas. Em seguida, uma solução de PBS foi injetada nos microcanais com vazão de 12,5 µL/min para realizar as medições elétricas.

[85] Como controle negativo, uma região do DNA do HPV18 foi usada como modelo para sintetizar uma sequência de oligonucleotídeos referida como ssDNA negativo (ssNegativo).

Os espectros de capacitância foram utilizados para construir curvas de calibração, determinando parâmetros analíticos como limite de detecção, limite de quantificação e faixa de trabalho, além de estudos de adsorção de ssHPV16. Os dados podem ser usados para determinar a presença ou ausência de HPV16 em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço com status de HPV previamente conhecido e cópia viral

[86] A Figura 5A, B mostra os espectros de capacitância para o biossensor exposto a diferentes concentrações de ssHPV16 a 22 e 55 ° C de temperaturas de hibridização.

[87] Mudanças nos espectros são observadas em frequências abaixo de 100 Hz, nas quais modificações na dupla camada elétrica são induzidas pelas interações em nível molecular. As mudanças são muito maiores para a temperatura de hibridização de 55 °C, o que significa que esta é uma condição otimizada para a fabricação de biossensores. As curvas de calibração podem ser obtidas plotando a capacitância a 1 Hz versus concentração nas inserções de Figura 5A e B. O limite de detecção foi calculado de acordo com Recomendação da IUPAC (Currie, 1995). O limite de detecção foi de 60,2 e 10,5 pM para o biossensores fabricados com temperaturas de hibridização de 22 e 55 °C, respectivamente. Esse desempenho é superior a outros dispositivos analíticos para detectar ssHPV16, como os imunossensores feitos com eletrodos impressos em carbono modificados com pirrolidinilpeptídeos (4 nM), imunossensores em Au eletrodos modificados com filme fino de L-cisteína (18 nM), e teste de genotipagem ssHPV16 com um arranjo de 16 eletrodos (100-200 pM). Com a temperatura otimizada de 55 °C, a faixa de trabalho do biossensor também é estendida, pois a saturação

do sinal (isto é, saturação de sites ativos devido à interação irreversível entre o controle positivo para ssHPV16 e sonda cpHPV16) ocorre em 5,1 nM, em contraste com 4,6 nM para a temperatura de hibridização de 22 °C. O maior desempenho do biossensor fabricado com hibridização a 55 °C era esperado porque esta temperatura corresponde ao valor otimizado para hibridização, enquanto a temperatura de 22 °C foi utilizada apenas para fins de comparação.

[88] Para validar a otimização da fabricação de biossensores e verificar a eficiência de detecção de HPV16, as linhagens celulares de câncer cervical CaSki e SiHa e as linhas celulares de câncer de cabeça e pescoço JHU12, JHU13, JHU28, UMSCC47, UM-SCC104 e 93-VU147T foram analisadas usando mapas de visualização de informações obtidos a partir dos espectros de capacitância das linhagens celulares e comparados com as diferentes diluições do controle positivo para ssHPV16. Na projeção do IDMAP na Figura 6, dois clusters podem ser identificados, nos quais no controle positivo para ssHPV16 a concentração aumenta da esquerda para a direita. As linhagens celulares JHU12, JHU13 e JHU28 foram classificadas corretamente como "HPV16 negativo" porque elas não possuem integração do genoma do HPV16, enquanto as demais linhagens celulares de cabeça e pescoço (UM-SCC47, UM-SCC104 e 93-VU147T), bem como CaSki e SiHa, foram classificadas como "HPV16 positivo". Em resumo, o biossensor é robusto para detectar traços de DNA do HPV16 no controle positivo para ssHPV16 e DNA genômico das linhas celulares que abrigam o HPV16.

Exemplo 5 - Análise de Dados

[89] Experimentos de detecção com sensores e biossensores usando espectroscopia de impedância normalmente levam a grandes quantidades de dados multidimensionais, que são tratados com métodos estatísticos para reduzir sua dimensionalidade. Para espectros de impedância ou capacitância, por exemplo, isso significa que todo o espectro - cuja dimensão pode ser cerca de 70, que é o número de frequências utilizadas nas medições - é representado como um marcador no espaço bidimensional projetado. As técnicas para essa redução de dimensionalidade são referidas como técnicas de projeção multidimensionais, como a análise de componentes principais (PCA) e mapeamento interativo de documentos (IDMAP).

[90] 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 papilomavírus humano (HPV-16) **caracterizado** por compreender um eletrodo interdigitado revestido com pelo menos uma bicamada de filmes nanoestruturados, onde a bicamada de filmes nanoestruturados é composta de uma camada de um polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina e uma camada de um glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico, e uma sonda específica para a detecção de HPV-16, onde a sonda é um polinucleotídeo compreendendo um grupo 5-NH₂-C₆.

2. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina ser quitosana.

3. Biossensor, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico ser sulfato de condroitina.

4. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** pela sonda específica para a detecção de HPV-16 ter a sequência [NH₂-C₆] CAAGCAGAACCGGACAG (SEQ ID. NO. 1).

5. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pela camada de um polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina estar em contato com o eletrodo e/ou a camada de um glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico.

6. Biossensor, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pela camada de um glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico

estar em contato com a camada de um polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina e/ou a sonda específica para a detecção de HPV16.

7. Processo de produção de biossensor, conforme definido nas reivindicações 1 a 6, **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) Injeção de uma solução de 0,5 a 2,0 mg/ml de um polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina, a um pH na faixa de 4 a 5, no microcanal do chip microfluídico;
- b) Injeção de uma solução de 0,5 a 2,0 mg/ml de um glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico, a um pH na faixa de 4 a 5, no microcanal do chip microfluídico;
- c) Injeção de uma solução mista de 0,05M a 0,5M de N-hidroxissuccinimida (NHS)/ 0,05M a 0,5M de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) no microcanal do chip microfluídico; e
- d) Injeção da sonda específica para a detecção de HPV-16.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo polissacarídeo compreendendo unidades de D-glicosamina e/ou N-acetil-D-glicosamina ser quitosana.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo glicosaminoglicano compreendendo unidades de ácido urônico ser sulfato de condroitina.

10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, **caracterizado** por compreender uma etapa de lavagem para remoção de material não-ligado após cada

etapa de injeção.

11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, **caracterizado** pelas etapas a) e b) serem repetidas antes da etapa c), de modo a criar novas bicamadas sobre o eletrodo.

12. Kit diagnóstico para papilomavírus humano (HPV-16) **caracterizado** por compreender:

- a) Um biossensor conforme definido nas reivindicações 1 a 6; e
- b) meios para solubilização da amostra.

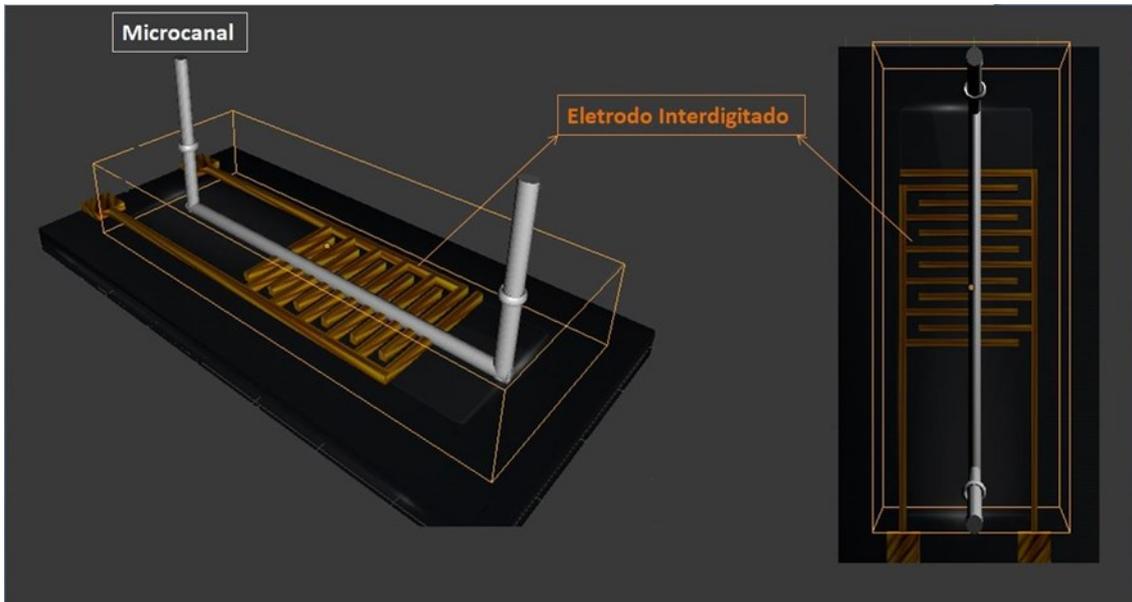


Figura 1

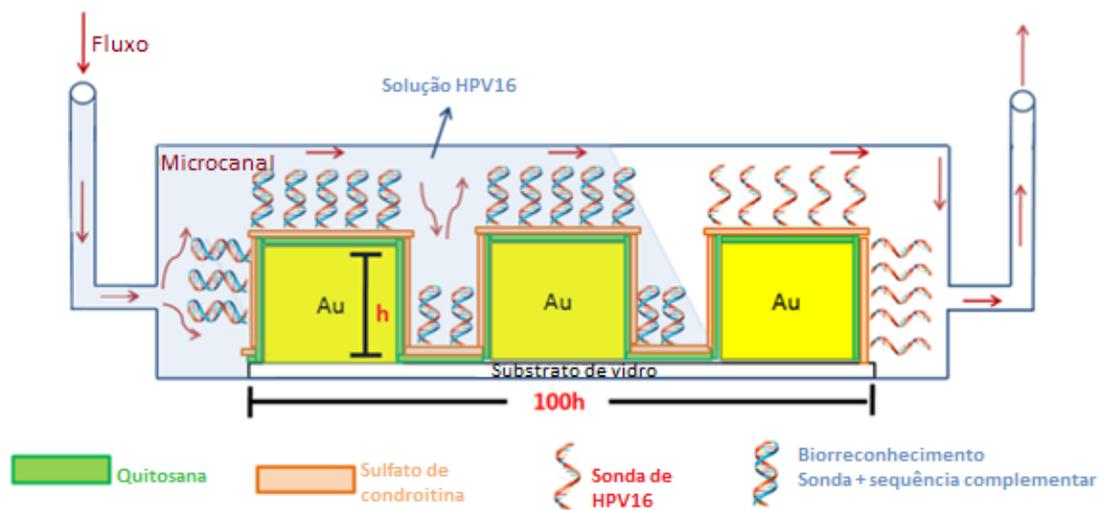


Figura 2

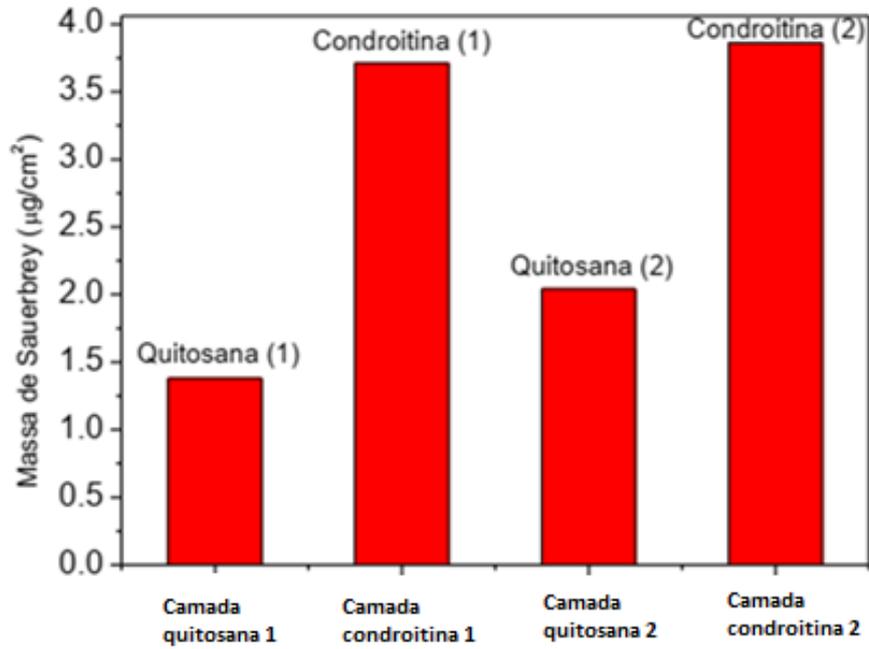


Figura 3

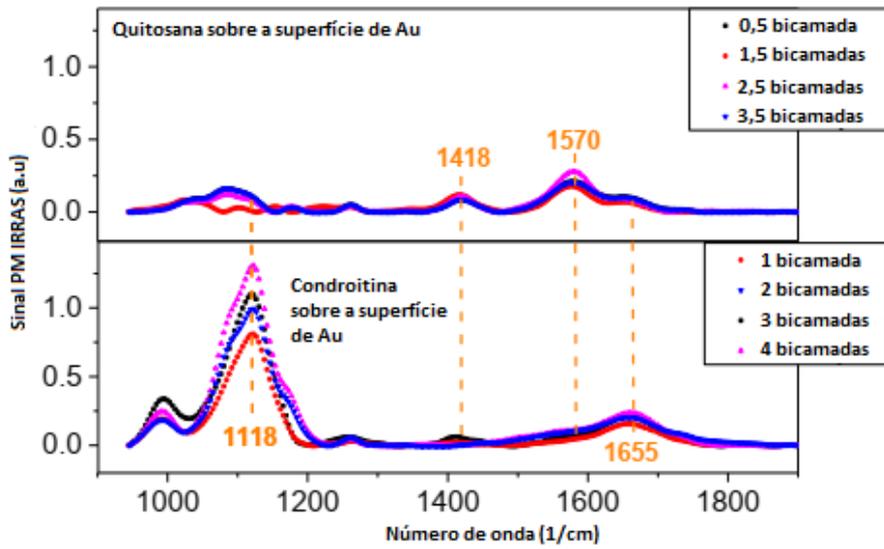


Figura 4

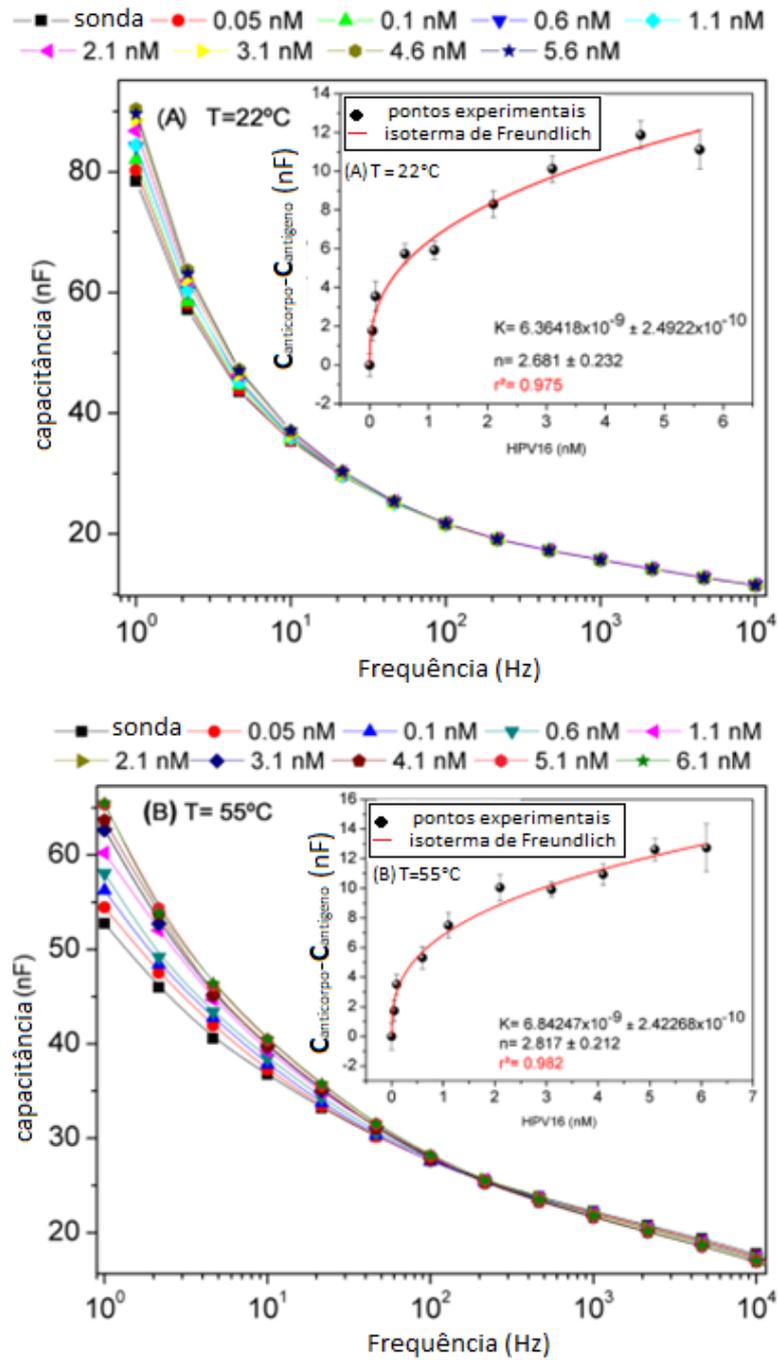


Figura 5

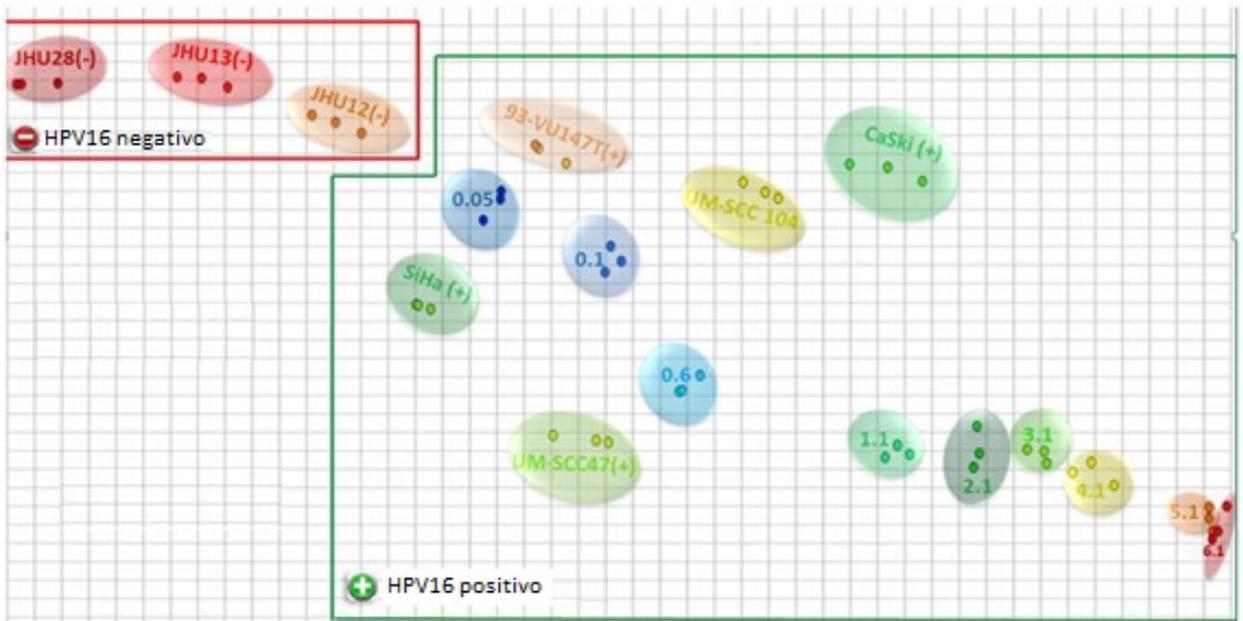


Figura 6

RESUMO**BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV-16), PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOSSENSOR E KIT DE DETECÇÃO PARA HPV-16**

A presente invenção refere-se a um biossensor para detecção de papilomavírus humano (HPV-16) através da variação de impedância, formado por um eletrodo interdigitado, uma sonda de DNA específica e matriz de sulfato de condroitina e quitosana. A presente invenção refere-se também a um kit de detecção compreendendo o biossensor e meios para solubilização da amostra. A presente invenção ainda apresenta o processo de produção do referido biossensor. A presente invenção apresentou um desempenho muito superior ao de outros dispositivos similares, com limites de detecção na ordem de picomolar (pM) e ausência de interferentes nos testes de seletividade dos biossensores.

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 HPV-16.txt
- Data de Geração do Código: 08/10/2019
- Hora de Geração do Código: 19:13:15
- Código de Controle:
 - Campo 1: 04387EB4B1F76CAF
 - Campo 2: 19848F282D9889DC