



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106062** (13) **U**

(51) МПК (2016.01)

G01N 33/00

G01N 33/02 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 11108	(72) Винахідник(и): Степурська Катерина Володимирівна (UA), Архипова Валентина Миколаївна (UA), Коробко Максим Юрійович (UA), Солдаткін Олександр Олексійович (UA), Дзядевич Сергій Вікторович (UA), Циганенко Катерина Степанівна (UA), Савчук Ярослав Ігорович (UA), Зайченко Олександр Максимович (UA)
(22) Дата подання заявки: 12.11.2015	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA), ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 154, м. Київ, 03143 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.04.2016	(74) Представник: Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.04.2016, Бюл.№ 7	

(54) ФЕРМЕНТНИЙ ПОТЕНЦІОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР ДЛЯ ЕКСПРЕС-АНАЛІЗУ АФЛОТОКСИНІВ У ПРОБАХ ЗЕРНОВИХ

(57) Реферат:

Ферментний потенціометричний біосенсор для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових складається з потенціометричного датчика на основі двох рН-чутливих польових транзисторів, на один з яких нанесена робоча ферментна мембрана на основі ацетилхолінестерази, що є чутливою до афлатоксинів, на другий нанесена мембрана порівняння на основі сироваткового альбуміну білка. Вказаний біосенсор інтегрований до вимірювальної комірки, в яку встановлений і електрод порівняння, виходи датчиків призначені для підключення до відповідних входів аналого-цифрового іонно-сенсорного вимірювача параметрів рідких середовищ для вимірювання сигналів потенціометричних датчиків на основі іон-селективних польових транзисторів, а виходи згаданого приладу призначені для підключення до відповідних входів комп'ютера.

UA 106062 U

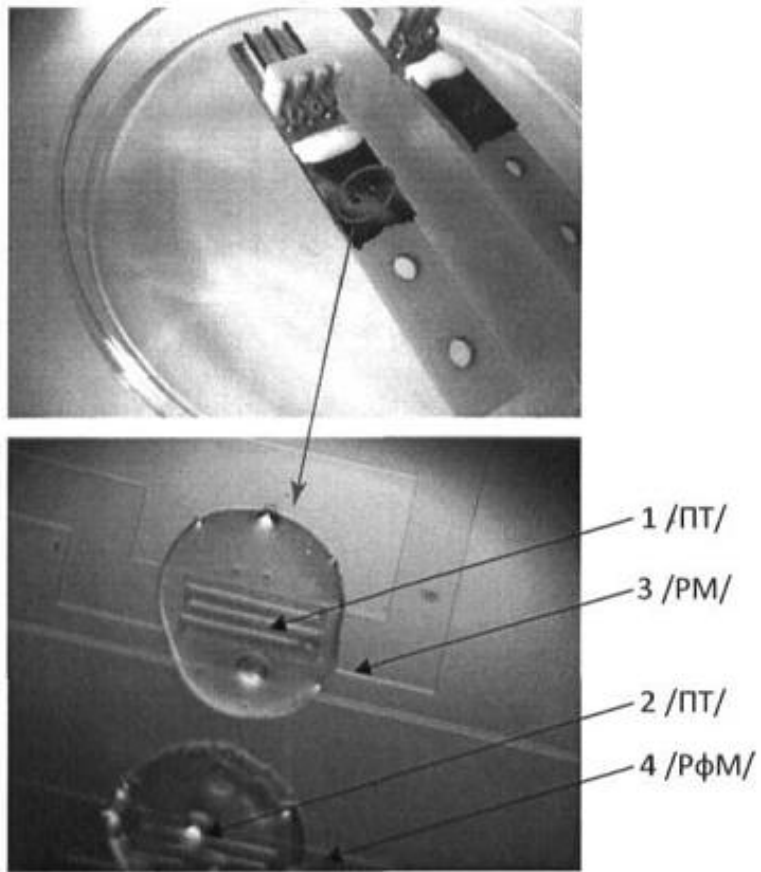


Fig. 1

Пропонована корисна модель належить до галузі екології і може бути застосована, зокрема для експрес-аналізів зернових, для оцінки наявності та визначення концентрації афлатоксинів, а більш конкретно до конструкції аналітичних систем для моніторингу токсичних речовин у розчинах, а саме до ферментного потенціометричного біосенсора для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових.

Афлатоксини - це вторинні метаболіти деяких видів грибів роду *Aspergillus* [1]. Можливість контамінації багатьох продуктів харчування та кормів для тварин цими грибами зумовлена невідповідністю умов їх зберігання до регламентованих стандартів. Наслідком такої контамінації, з високою ймовірністю, може бути забруднення харчових продуктів та кормів комплексом афлатоксинів, що є найбільш характерним для сировини рослинного походження. Ураження афлатоксинами найбільш розповсюджене для кукурудзи, зернових, зокрема пшениці та рису, а також горіхів з великим вмістом олії та для спецій [2].

Комплекс афлатоксинів включає чотири сполуки - афлатоксини B1, B2, G1 та G2, а також понад десять мінорних сполук, які є їх похідними [3]. Найбільш токсичний та канцерогенний серед всіх афлатоксинів - афлатоксин B1 (АФВ1). Міжнародне агентство з вивчення раку відносить його до 1 категорії небезпеки - канцерогенний для людини [4]. У зв'язку з його великою розповсюдженістю високою токсичністю багато країн прийняли нормативні документи, які регулюють рівень АФВ1 в продовольстві, сировині та кормах. Регламентований рівень визначення АФВ1 в різних продуктах харчування складає від 0,05-20 нг/мл [5].

У зв'язку з вище викладеним, постійний ефективний контроль наявності афлатоксинів є обов'язковим для запобігання отруєнь. До класичних методів визначення афлатоксинів відносять тонкошарову хроматографію [6], високоефективну рідинну хроматографію [7], різні поєднання рідинної хроматографії з мас-спектрометрією [8] та імуноферментний аналіз [9]. Ці методи потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання. Ще одним недоліком наведених методів аналізу є необхідність в складній попередній підготовці проб, що виливається у великі затрати часу та коштів. Тому сьогодні постає дуже актуальне питання створення більш зручного, точного, селективного, швидкого та дешевого методу визначення афлатоксинів.

На основі проведення патентно-інформаційних досліджень авторами роботи було встановлено, що на сьогодні в галузі біосенсорики існує обмежена кількість даних щодо розробки біосенсорів для визначення афлатоксинів. Існує ряд публікацій, присвячених біосенсорному визначенню афлатоксинів з використанням принципу поверхневого плазмонного резонансу [10-12]. Робота цих біосенсорів основана на використанні імунного або імуно-ферментного методів аналізу. Біосенсори на основі цих методів характеризуються складністю та тривалістю процедури аналізу, дороговизною матеріалів при виготовленні самих біосенсорів [13-15]. Інші варіанти біосенсорів для визначення афлатоксинів, що існують на даний момент у світі, це амперометричні [16-19]. В основі біоселективних елементів даних біосенсорів використовують або афлатоксинооксидазу [16, 17], або ацетилхолінестеразу [18, 19]. Але, порівняно з потенціометричними біосенсорами на основі тих самих ферментних систем, описані амперометричні біосенсори мають ряд недоліків, таких, як потреба у наявності допоміжних речовин - медіаторів в складі біоселективного елемента або/та недостатня чутливість та селективність за рахунок чутливості амперометричних перетворювачів до інтерферуючих електроактивних речовин. Також усі розроблені на сьогодні біосенсори майже не адаптовані для роботи з реальними зразками.

Відомий амперометричний біосенсор для визначення концентрації афлатоксину у водних розчинах, який має один амперометричний електрод, на який нанесена робоча мембрана на основі ацетилхолінестерази, а сам біосенсор призначений для підключення до амперометричної установки [18]. Недоліками описаного пристрою є те, що він є менш чутливим, селективним та значно складнішим під час його приготування.

Відомий біосенсор на основі ацетилхолінестерази, іммобілізованої на кондуктометричний перетворювач [20]. Недоліками описаного пристрою є те, він не адаптований для визначення афлатоксину B1 в пробах зернових, оскільки кондуктометричний метод вимірювання чутливий до інших компонентів проб. Відповідно, запропонований у даній заявці біосенсорний метод є більш селективним та може бути використаний для роботи з реальними зразками.

В основу пропонованої корисної моделі поставлено задачу створення ферментного потенціометричного біосенсора для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових, який би не потребував складного громіздкого обладнання та був би більш селективним порівняно з відомими біосенсорами.

Поставлена задача вирішується пропонованим ферментним потенціометричним біосенсором для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових, який складається з

потенціометричного датчика на основі двох рН-чутливих польових транзисторів, на один з яких нанесена робоча ферментна мембрана на основі ацетилхолінестерази, що є чутливою до афлатоксинів, на другий нанесена мембрана порівняння на основі сироваткового альбуміну білка, вказаний біосенсор інтегрований до вимірювальної комірки, в яку встановлений і

електрод порівняння, виходи датчиків призначені для підключення до відповідних входів

аналого-цифрового іонно-сенсорного вимірювача параметрів рідких середовищ для вимірювання сигналів потенціометричних датчиків на основі іон-селективних польових транзисторів, а виходи згаданого приладу призначені для підключення до відповідних входів комп'ютера.

Суть пропонованої корисної моделі пояснюється кресленнями, де:

на Фіг. 1 представлено загальний вигляд пропонованого ферментного потенціометричного біосенсора на основі рН-ПТ для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах та мікрофото області мембран;

на Фіг. 2 наведено фото зразків пшениці, зараженої грибом *Aspergillus flavus* (15 та 21 доба

культивування).

на Фіг. 3 продемонстровано відгуки біосенсора на основі рН-ПТ на додавання субстрату та афлатоксину В1 на реальному прикладі проведення експерименту;

на Фіг. 4 наведено калібрувальний графік визначення концентрації афлатоксину В1.

Ферментний потенціометричний біосенсор для визначення концентрації афлатоксинів у водних пробах складається:

- з двох рН-чутливих р-канальних польових транзисторів 1 та 2 (ПТ) як перетворювачів (Фіг. 1). На поверхню транзистора 1 нанесена робоча мембрана 3 (РМ), яка містить у собі фермент ацетилхолінестеразу, селективний до афлатоксинів, на поверхню транзистора 2 (ПТ) нанесена референтна мембрана 4 (РФМ) на основі сироваткового альбуміну білка;

- портативної системи на основі іон-селективних польових транзисторів, що ідентична системі, яка описана в [21].

В основі роботи ферментного потенціометричного біосенсора на основі рН-ПТ для визначення афлатоксинів лежить ефект інгібування ферменту ацетилхолінестерази афлатоксинами. Реакція розщеплення субстрату під каталітичною дією ферменту має наступний вигляд:

АХЕ



В процесі ферментативної реакції ацетилхолінестераза розщеплює ацетилхолін, при цьому збільшується концентрація протонів в робочій мембрані, відповідно, відбувається зміна рН, яку і можна реєструвати за допомогою рН-ПТ. За допомогою ІСПТ з рН-чутливим шаром відбувається перетворення біохімічного сигналу в електричний, що дозволяє реєструвати відгуки біосенсора на додавання субстрату. Для аналізу концентрації афлатоксинів необхідно додати досліджуваний зразок у кювету з ІСПТ, на який нанесено фермент, при цьому в ході контакту з афлатоксинами відбувається інгібування ферменту. В процесі ферментативної реакції при наявності афлатоксинів розщеплюється менше ацетилхоліну, що призводить до зміни рН в мембрані у меншій мірі ніж без афлатоксинів. В залежності від цієї різниці і визначали наявність афлатоксинів в досліджуваному зразку.

Пропонований ферментний потенціометричний біосенсор для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових працює наступним чином.

На робочу поверхню рН-ПТ 1 (ПТ) потенціометричного біосенсора наносили вихідну суміш для створення робочої мембрани 3 (РМ) (об'єм 25-70 нл), яку вносили в насичені пари глутарового альдегіду (ГА) на 15-20 хвилин. Цю робочу мембрану готували із 20 мМ фосфатного буфера, рН 7.0, і наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас. %):

ацетилхолінестераза 0,5-2

сироватковий альбумін бика (БСА) 0,5-2

гліцерин 6-14.

На інший рН-ПТ 2 (ПТ) наносили вихідну суміш для створення референтної мембрани 4 (РФ) (25-70 нл), яку вносили в ГА на 15-20 хвилин, цю мембрану формували з 20 мМ фосфатного буфера, рН 7.0, і наступних інгредієнтів у такому їх співвідношенні (у мас. %):

БСА 1,5-3

гліцерин 6-14.

Співвідношення компонентів біоселективних мембран біосенсорної системи було отримано експериментально. Його підібрали для покращення аналітичних характеристик біосенсорів,

таких як час відгуку, селективність, чутливість, операційна стабільність та ін. Після процесу іммобілізації біосенсиори висушували 15 хв. на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи, для видалення надлишку незв'язаних ферменту та інших компонентів мембран, біосенсиори відмивали протягом 20 хв. у буфері, в якому і проводили подальші досліді.

Вимірювання проводили за допомогою аналого-цифрового іоно-сенсорного вимірювача параметрів рідких середовищ, розробленого та виготовленого в Інституті фізики напівпровідників ім. В.С. Лашкарьова НАН України [22], що працює по схемі прямого вимірювання струму в каналі польового транзистора з активним навантаженням. Чутливість приладу становила близько 25 мкА/рН. До входу приладу підключався двоелементний потенціометричний ферментний біосенсор, а також електрод порівняння. Вихід приладу підключався до комп'ютера через послідовний COM або USB порт. Пропоновану систему використовували наступним чином. Попередньо виготовляли біоселективні мембрани. Створення ферментного біосенсора (Фіг. 1): виготовляли робочу мембрану 33 (РМ). Для цього готували розчин з вмістом 1 % ацетилхолінестерази, 1 % БСА та 10 % гліцерину у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7.0. Референтну мембрану 4 (РфМ) виготовляли таким же чином, але замість наважки фермента брали лише 2 % БСА. Гліцерин у складі мембран 3 (РМ), 4 (РфМ) використовувався для стабілізації ферменту при іммобілізації та запобігання передчасного підсихання розчину, нанесеного на поверхню перетворювача до його внесення в ексикатор з ГА для ковалентної зшивки. В свою чергу, БСА в складі робочої мембрани 3 (РМ) відігравав роль стабілізуючого агента для фермента. Для створення мембран біосенсора, відповідно 3 (РМ) та 4 (РфМ), краплю суміші ацетилхолінестераза-БСА (50 нл) наносили на затворну область поверхні перетворювача 1 (ПТ), а на іншу 2 (ПТ) - розчин БСА без ферменту (це був датчик порівняння). Для іммобілізації мембран датчики розміщували в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду (ГА) на 15-20 хв. і потім підсушували на повітрі й відмивали від надлишку ГА у буферному розчині протягом 10-20 хв. Зразки для визначення афлатоксинів були підготовлені за наступним методом. Продукт афлатоксину В1 (*Aspergillus flavus*) культивували на різних субстратах (пшениця та овес) протягом 21 доби (фіг. 2). Заражені субстрати висушували при температурі не більше 60 °С, подрібнювали до стану муки, додавали невелику кількість 4 %-вого KCl та екстрагували протягом 30 хвилин при інтенсивному перемішуванні. Екстракцію із пшениці та вівса проводили, використовуючи як екстрагент ацетонітрил, екстракти упарювали під зниженим тиском без світла до сухого залишку. Отриманні зразки розчиняли в 10 мл метанолу та фільтрували від твердих домішок, які можуть механічно пошкодити робочу мембрану біосенсора. Подальша робота проводилась з отриманими таким чином препаратами.

Перед початком вимірювань з нанесеними мембранами біосенсор встановлювали у вимірювальній комірці та додавали 2,5 мл 5 мМ буферного розчину, рН 7.4, витримували 10-20 хв. для отримання стабільного базового сигналу. Далі в комірку додавали 4 мМ АХХ і отримували сигнал (фіг. 3), величину відгуку якого приймали за 100 %. Потім додавали модельний афлатоксин В1 певної концентрації та отримували зменшення відгуку сенсора. Рівень інгібування визначали по співвідношенню відгуків біосенсора до та після інгібування, згідно з наступною формулою:

$$I \% = (A_0/A_i) * 100 \%,$$

де A_0 - відгук біосенсора на субстрат до інгібування, A_i - відгук біосенсора на субстрат після інгібування. Після цього отримували залежність рівня інгібування іммобілізованої ацетилхолінестерази при додаванні в розчин різних концентрацій афлатоксину В1 - одержували калібрувальний графік (Фіг. 4), за допомогою якого визначали концентрацію афлатоксину В1 в досліджуваних пробах зернових.

Використовуючи даний біосенсор, була встановлена концентрація афлатоксину в перерахунку на афлатоксин В1 у зразках пшениці та вівса, заражених *Aspergillus flavus*. Концентрація афлатоксину у пробах пшениці складала 180 мкг/мл, а у пробах вівса - 150 мкг/мл. Визначення афлатоксинів запропонованим ферментним потенціометричним біосенсором для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових, дозволило проводити селективний аналіз проб зернових за з використанням потенціометричного методу вимірювання, а сам біосенсор є портативним, що дає можливість проведення експрес-аналізу в польових умовах.

Джерела інформації:

1. S.S. Saini, A. Kaur Aflatoxin B1: Toxicity, characteristics and analysis: Mini review // Global Advanced Research Journal of Chemistry and Material Science. - 2012. - Vol. 1(4). - P. 063-070.

2. I.B. Rejeb, F. Arduini, A. Arvinte, A. Amine, M. Gargouri, L. Micheli, C. Bala, D. Moscone, G. Palleschi Development of a bio-electrochemical assay for AFB1 detection in olive oil // Biosensors and Bioelectronics. - 2009. - Vol. 24. - P. 1962-1968.

3. L. Campone, A.L. Piccinelli, R. Celano, L. Rastrelli Application of dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in cereal products // *Journal of Chromatography A*. - 2011. - Vol. 1218. - P. 7648-7654.
4. M. Ren, H. Xu, X. Huang, M. Kuang, Y. Xiong, H. Xu, Y. Xu, H. Chen, A. Wang
5 Immunochromatographic Assay for Ultrasensitive Detection of Aflatoxin B1 in Maize by Highly Luminescent Quantum Dot Beads // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. - 2014. - Vol. 6. - P. 14215-14222.
5. X. Guo, F. Wen, N. Zheng, Q. Luo, H. Wang, H. Wang, S. Li, J. Wang Development of an ultrasensitive aptasensor for the detection of aflatoxin B1 // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2014. - Vol. 56. - P. 340-344.
- 10 6. I. Var, B. Kabak, F. Gok Survey of aflatoxin B1 in helva, a traditional Turkish food, by TLC // *Food Control*. - 2007. - Vol. 18. - P. 59-62.
7. W.S. Khayoon, B. Saad, C. B. Yan, N.H. Hashim, A. S. M. AH, M. I. Salleh, B.Salleh Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up // *Food Chemistry*. - 2010. Vol. 118. - P. 882-886.
- 15 8. M. Solfrizzo, A. De Girolamo, V.M.T. Lattanzio, A. Visconti, J. Stroka, A. Alldrick, H.P. van Egmond Results of a proficiency test for multi-mycotoxin determination in maize by using methods based on LC-MS/(MS) // *Quality Assurance and Safety of crops & foods*. - 2013. - Vol. 5(1). - P. 15-48.
9. W. Jiang, Z. Wang, G. Nolke, J. Zhang, L. Niu, J. Shen Simultaneous Determination of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 in Food Matrices by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // *Food Anal. Methods*. - 2013. Vol. 6. - P. 767-774.
- 20 10. Y. Li, X. Liu, Z. Lin Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs // *Food Chemistry*. - 2012. - Vol. 132. - P. 1549-1554.
- 25 11. S. Ko, C.J. Kim, D.Y. Kwon Detection of aflatoxin B1 by SPR biosensor using fusion proteins as a linker // *Proceedings of the 2010 NSTI Nanotechnology Conference and Expo*, 978-1439834183, Anaheim, 978-1-4398-3418-3, CA, June 2010.
12. M. Cuccioloni, M. Mozzicafreddo, S. Barocci, F. Ciuti, I. Pecorelli, A.M. Eleuteri, M. Spina, E. Fioretti, M. Angeletti Biosensor-based screening method for the detection of aflatoxins B1-G1 // *Anal. Chem.* - 2008. - Vol. 80. - P. 9250-9256.
- 30 13. K. E. Sapsford, C. R. Taitt, S. Fertig, M.H. Moore, M. E. Lassman, C.M. Maragos, L. C Shriver-Lake Indirect competitive immunoassay for detection of aflatoxin B1 in corn and nut products using the array biosensor // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2006. - Vol. 21. - P. 2298-2305.
14. Y. Liu, Z.Qin, X. Wu, H. Jiang Immune-biosensor for aflatoxin B1 based bio-10 electrocatalytic reaction on micro-comb electrode // *Biochemical Engineering Journal*. - 2006. - Vol. 32.- P. 211-217.
- 35 15. M.A. Carlson, CB. Bargerion, R.C. Benson, A.B. Fraser, T.E. Phillips, J.T. Velky, J.D. Groopman, P.T. Strickland, H.W. Ko An automated, handheld biosensor for aflatoxin // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2000. - Vol. 14. - P. 841-848.
16. Junhua Chen, Daling Liu, Shichuan Li, Dongsheng Yao Development of an amperometric enzyme electrode biosensor for sterigmatocystin detection // *Enzyme and Microbial Technology*. - 2010. - Vol. 47. - P. 119-126.
- 40 17. Shi chuan Li, Jun hua Chen, Hong Cao, Dong sheng Yao, Da ling Liu Amperometric biosensor for aflatoxin B1 based on aflatoxin-oxidase immobilized on multiwalled carbon nanotubes // *Food Control*. - 2011. - Vol. 22. - P. 43-49.
- 45 18. Tamara Hansmann, Benoit Sanson, Jure Stojan, Martin Weik, Jean-Louis Marty, Didier Fournier Kinetic insight into the mechanism of cholinesterase inhibition by aflatoxin B1 to develop biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2009. - Vol. 24. - P. 2119-2124.
19. Miroslav Pohanka, Daniel Jun, Kamil Kuca Aflatoxin assay using an acetylcholinesterase based biosensor // *Toxicology Letters*. - 2008. - Vol. 180. - P. 73.
- 50 20. О.О. Солдаткін, О.С. Бурдак, Л.В. Шкотова, Т.А. Сергеева, С.В. Дзядевич, О.П. Солдаткін. Кондуктометричний біосенсор для визначення афлатоксинів у водних розчинах. // Патент України на корисну модель № 75156. - Подано: 20.04.2012. - Опубліковано: 26.11.2012, бюл. № 22.
21. В.М. Архипова, М.К. Шелякіна, О.О. Солдаткін, С. В. Дзядевич. Ферментний потенціометричний біосенсор для визначення 1-аргініну у водних розчинах на основі рН-чутливих польових транзисторів та ефекту інгібування уреаз. // Патент України на винахід № 105570. - Подано: 26.10.2012. - Опубліковано: 26.05.2014, бюл. № 10.
- 55 22. Кукла О.Л., Павлюченко О.С, Бушма О.В., Голтвянський Ю.В., Дзядевич СВ., Солдаткін О.П. Патент України на корисну модель "Аналого-цифровий іонно-сенсорний вимірювач

параметрів рідких середовищ", UA № 48359, МПК G01N 27/26, 27/27, заявл. 26.10.2009, опубл. 10.03.2010, бюл. № 5.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5 Ферментний потенціометричний біосенсор для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових, який складається з потенціометричного датчика на основі двох рН-чутливих польових транзисторів, на один з яких нанесена робоча ферментна мембрана на основі ацетилхолінестерази, що є чутливою до афлатоксинів, на другий нанесена мембрана порівняння на основі сироваткового альбуміну білка, вказаний біосенсор інтегрований до вимірювальної комірки, в яку встановлений і електрод порівняння, виходи датчиків призначені для підключення до відповідних входів аналого-цифрового іонно-сенсорного вимірювача параметрів рідких середовищ для вимірювання сигналів потенціометричних датчиків на основі іон-селективних польових транзисторів, а виходи згаданого приладу призначені для підключення до відповідних входів комп'ютера.

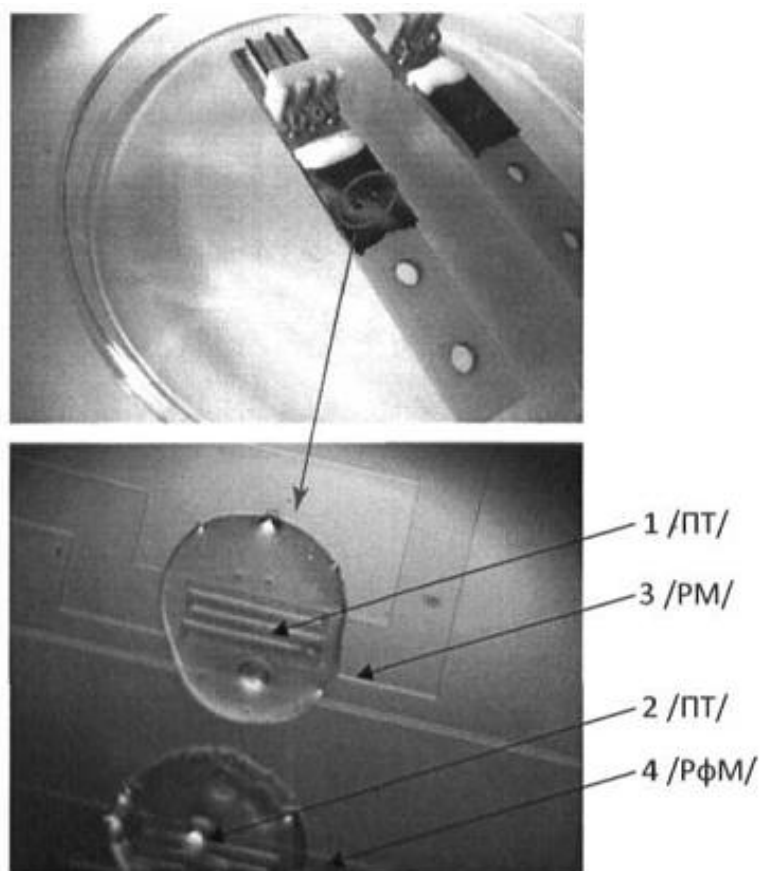


Fig. 1

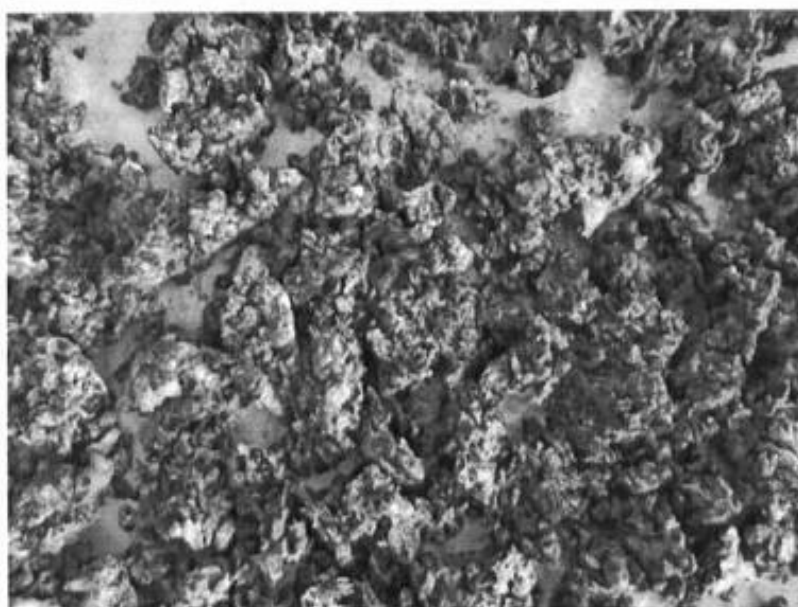


Fig. 2

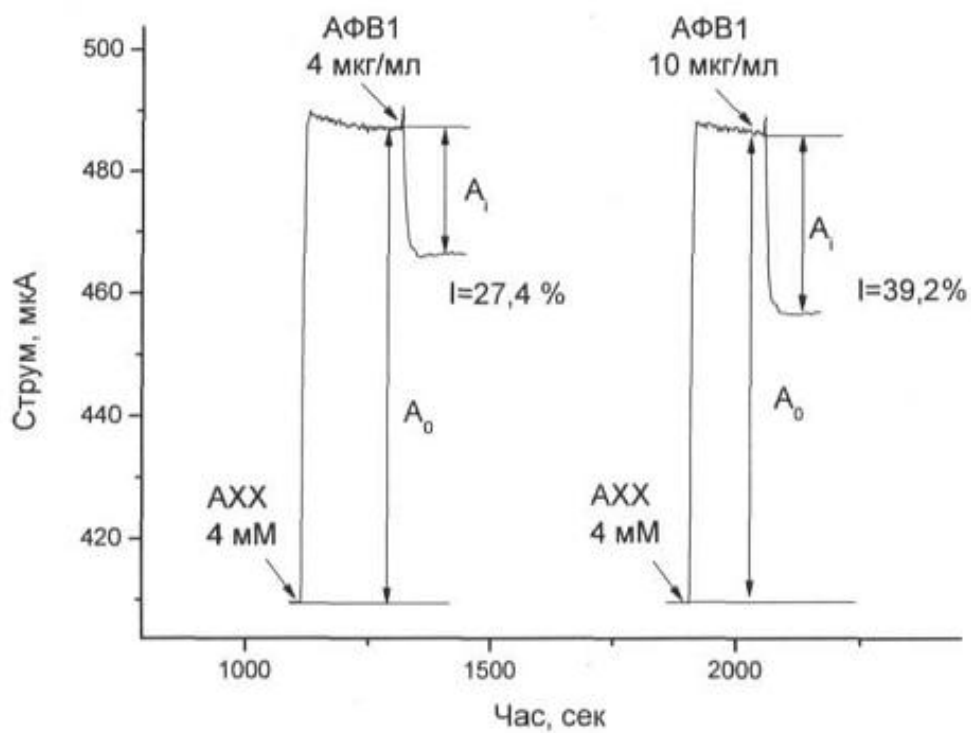


Fig. 3

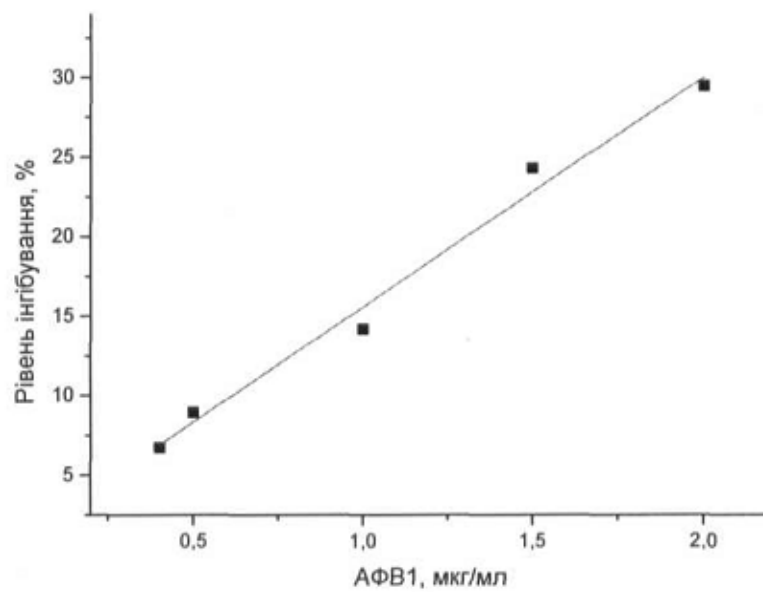


Fig. 4

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601