RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235045**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **412413**

(22) Data zgłoszenia: **21.05.2015**

(51) Int.Cl.
G01N 21/55 (2014.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) **Biosensor do oznaczania fibronektyny osoczowej z wykorzystaniem przeciwciała**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
05.12.2016 BUP 25/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
18.05.2020 WUP 05/20

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU, Białystok, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
ANNA SANKIEWICZ, Białystok, PL

PL 235045 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do oznaczania fibronektyny.

Fibronektyna stanowi grupę glikoprotein obecnych na powierzchni komórek. Występuje najczęściej w macierzy pozakomórkowej oraz w płynach biologicznych. Struktura i właściwości fibronektyny są zróżnicowane i zależą od miejsca występowania tego związku Fibronektyna będąca składnikiem macierzy pozakomórkowej odgrywa ważną rolę w procesach adhezji, proliferacji, rozpłaszczaniu i migracji komórek, embriogenezie, angiogenezie oraz procesach naprawczych *[D. Krzyżanowska-Gołąb, A. Lemańska-Perek, I. Kątnik-Prastowska. Fibronektyna jako aktywny składnik macierzy pozakomórkowej, Postępy Hig. Med. Dosw. 2007, 61, 655–663].*

Zmiany konformacji fibronektyny podczas tworzenia macierzy oraz oddziaływanie z innymi składnikami macierzy stanowią jeden z nurtów badań nad jej funkcjonowaniem. Najważniejsze dotyczą udziału tego białka w procesie transformacji nowotworowej [*E. Ruoslahti, Fibronectin in cell adhesion and invasion, Cancer Metastasis Reviews 1984, 3, 43–51, B Fernandez-Garcia, N Eiró, L Marin, S González-Reyes, L.O. González, M.L.Lamelas, F.J. Vizoso., Expression and prognostic significance of fibronectin and matrix metalloproteases in breast cancer metastasis., Histopathology, 2014, 64 512–522].* Poznanie mechanizmów nieprawidłowej ekspresji i funkcji tego białka może przyczynić się do lepszego zrozumienia procesów związanych z powstawaniem, rozwojem i przebiegiem chorób nowotworowych.

Fibronektynę oznaczano metodą ELISA *[S. Ylätupa, C. Haglund, P. Mertaniemi, E. Vahtera, P. Partanen Cellular fibronectin in serum and plasma: a potential new tumour marker? Br J Cancer. Mar 1995; 71(3): 578-582., Ki-San Kim, Byung-Heon Lee, In-San Kim, The measurement of fibronectin concentration in human aqueous humor., Korean J. Ophthalmol, 1992, 6, 1–5], Western Bolt [C. Gaggioli, M.Deckert, G.Robert, P. Abbe, at all, HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1, Oncogene ,2005, 24, 1423–1433], immunofluorescencyjną [T. Veiling, J.Risteli, K Wennerberg, D.F. Mosher, S. Johansson, Polymerisation of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins,* $\alpha_{II}\beta_I$ *and* $\alpha_2\beta_1$*. J. Biol.Chem., 2002, 277, 37377–37381*, *immunocytochemiczną [Q. L. Zhu An immunocytochemical method for the localization of fibronectin in Araldite-embedded specimens, Histochemistry 1987, 86, 385–388]. Technikę SPR w wersji klasycznej wykorzystano do oznaczania fibronektyny płodowej, [Chen-Yu Chen, Chia-Chen Chang, Chun Yu, and Chii-Wann Lin, Clinical Application of Surface Plasmon Resonance-Based Biosensors for Fetal Fibronectin Detection, Sensors, 2012*; *12(4): 3879–3890] natomiast SPR w wersji imaging do badania oddziaływań komórek z fibronektyną [A. W. Peterson, M Halter, A. Tona, K. Bhadriraju, A.L. Plant., Surface plasmon resonance imaging of cells and surface-associated fibronectin., BMC Cell Biol. 2009 10:16, 1–17].*

Technika rezonansu powierzchniowego plazmonów (Surface Plasmon Resonance Imaging) jest niezwykle skutecznym narzędziem do oznaczania biologicznie aktywnych związków, została przedstawiona m.in. *[H.J. Lee, Y. Yan, G. Marriott, R.M. Corn*, *Quantitative functional analysis of protein complexes on surfaces. J Physiol, 2005, 563, 61–71, H.J. Lee, D. Nedelkov*, *R.M. Corn, Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of Antibody Arrays for the Multiplexed Detection of Low Molecular Weight Protein Biomarkers., Anal Chem, 2006, 78, 6504–6510*, *S. Fang, J. Lee, A.W. Wark, R.M. Corn*, *Attomole Microarray Detection of MicroRNAs by Nanoparticle-Amplified SPR Imaging Measurements of Surface Polyadenylation Reactions., J Am Chem Soc, 2006,128, 14044–14046*, *E. Gorodkiewicz, Surface Plasmon Resonance Imaging sensor for cathepsin determination based on immobilized cystatin., Protein Pept. Lett.,2009, 16, 1379–1385, E. Gorodkiewicz, E. Regulska, SPR Imaging Biosensor for Aspartyl Cathepsins: Sensor Development and Application for Biological Material., Protein Pept Let, 2010; 17: 1148–1154, E. Gorodkiewicz, H. Ostrowska, A Sankiewicz, SPR Imaging Biosensor for 20S proteasome: Sensor Development and Application for Measurement of Proteasomes in Human Blood Plasma, Microchim. Acta, 2011, 175,177–184, E. Gorodkiewicz, R. Charkiewicz, A. Rakowska, P. Bajko, L. Chyczewski, J. Niklinski, SPR Imaging Biosensor for Podoplanin: Sensor Development and Application for Biological Material, Microchim. Acta, 2012, 176, 337–343.*

Istotą wynalazku jest biosensor do oznaczania fibronektyny osoczowej z wykorzystaniem króliczego poliklonalnego przeciwciała specyficznego wobec tego rodzaju fibronektyny korzystnie techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów. Biosensor składa się ze szkiełka korzystnie typu BK7, na które nałożona jest warstwa złota korzystnie o grubości 50 nm, na podłożu chromu, następnie warstwa

funkcjonalizowanego tiolu korzystnie cysteaminy, a na nią warstwa króliczego poliklonalnego przeciwciała specyficznego wobec fibronektyny. Poszczególne partycje biosensora rozdzielone są polimerem.

Dzięki zastosowaniu rozwiązania według wynalazku uzyskuje się bardzo szybką analizę badanego materiału na stężenie fibronektyny.

Przedmiot wynalazku uwidoczniony jest na rysunku, na którym Fig. 1 przedstawia przekrój pionowy przez biosensor, natomiast Fig. 2 przedstawia krzywą kalibracyjną fibronektyny.

Biosensor składa się ze szkiełka (1) oraz czterech warstw. Spodnią warstwę biosensora stanowi chrom (3), na który nałożone jest złoto (2) korzystnie o grubości 50 nm, następnie tiolowy linker (4) oraz królicze, poliklonalne przeciwciało specyficzne wobec fibronektyny (5). Sensor na partycje dzieli siatka polimeru (6).

Sensor działa współpracując z urządzeniem do pomiarów techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji *Imaging* (SPRI). Sensor kładzie się na pryzmacie urządzenia. Odpowiednie przygotowanie sensora polega na zimmobilizowaniu na warstwie złota monowarstwy tiolu np. cysteaminy a na niej utworzenie monowarstwy króliczego poliklonalnego przeciwciała specyficznego wobec fibronektyny w zakresie stężeń 5–400 ng/mL. Na poszczególne pola sensora zawierające dużą liczbę miejsc aktywnych np. 12, nakłada się wzorzec fibronektyny osoczowej tak aby uzyskać stężenia 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400 ng/mL. Stężenia te odpowiadają prostoliniowemu odcinkowi krzywej kalibracyjnej fibronektyny. Na wolne pola nakłada się próbki osocza.

Rozcieńczane 10 000 razy próbki osocza nanoszone są na powierzchnie sensora na 10 minut. Objętość przenoszonego roztworu jest ok. 3 μl. Powierzchnia sensora jest przemywana co najmniej sześciokrotnie buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRI. Stężenie fibronektyny odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

P r z y k ł a d: Oznaczenie stężenia fibronektyny w próbkach osocza zdrowych dawców i pacjentów z rakiem pęcherza.

Z próbki osocza zdrowych dawców otrzymano następujące wartości intensywności sygnału SPR dla poszczególnych miejsc aktywnych:

1. 1824
2. 1737
3. 1658
4. 1752
5. 1853
6. 1656
7. 1729
8. 1586
9. 1847
10. 1796
11. 1734
12. 1820

Odczytane z krzywej stężenia fibronektyny po uwzględnieniu rozcieńczenia wynoszą odpowiednio:

1. 649
2. 567
3. 492
4. 581
5. 676
6. 490
7. 559
8. 424
9. 671
10. 623
11. 564
12. 651

Średnie stężenie wynosi 579 ng/mL.

Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności α = 0,05 wynosi 45.

Średni wynik określono (579 ± 45) ng/mL.

Z próbki osocza pacjentów z rakiem pęcherza otrzymano następujące wartości intensywności sygnału SPR dla poszczególnych miejsc aktywnych:

1. 3528
2. 3636
3. 3598
4. 3766
5. 3289
6. 3863
7. 3375
8. 3815
9. 3645
10. 3539
11. 3701
12. 3525

Odczytane z krzywej stężenia fibronektyny po uwzględnieniu rozcieńczenia wynoszą odpowiednio:

1. 2257
2. 2359
3. 2323
4. 2482
5. 2032
6. 2537
7. 2113
8. 2528
9. 2368
10. 2268
11. 2421
12. 2254

Średnie stężenie wynosi 2332 ng/mL.
Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności α = 0,05 wynosi 91.
Średni wynik określono (2332 ± 91) ng/mL.

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do oznaczania fibronektyny osoczowej składający się ze szkiełka (1) oraz czterech warstw, na które nałożona jest siatka polimeru (6) dzieląca sensor na partycje, przy czym spodnią warstwę biosensora stanowi chrom (3), na który nałożone jest złoto (2) korzystnie o grubości 50 nm, następnie tiolowy linker (4), a biosensor jest **znamienny tym**, że jego warstwę wierzchnią stanowi królicze, poliklonalne przeciwciało specyficzne wobec fibronektyny (5).

Rysunki

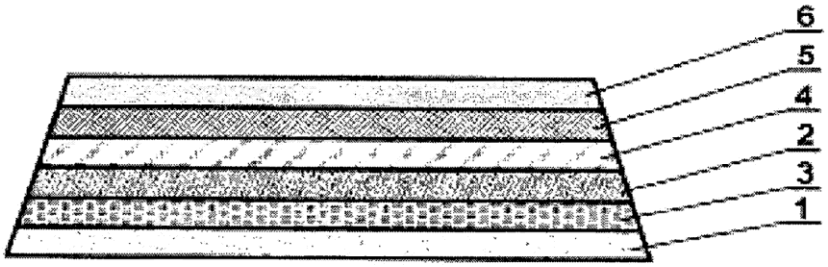


Fig. 1

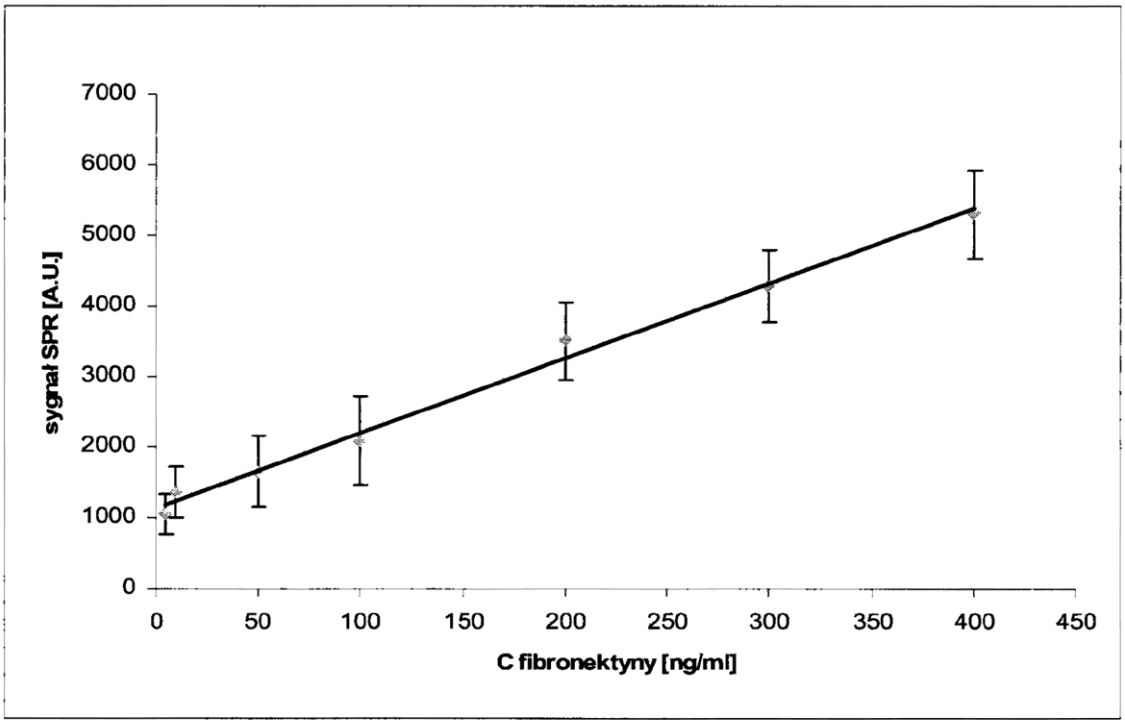


Fig. 2