

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 249084 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439848**

(22) Data zgłoszenia: **2021.12.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.06.19 BUP 25/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2026.02.23 WUP 08/2026**

(51) MKP:

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

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

(72) Twórca(-y) wynalazku:
EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
ŁUKASZ OŁDAK, Kętrzyn, PL
BOGDAN WYRWAS, Poznań, PL
ZENON ŁUKASZEWSKI, Kamionki, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Marcin Walkowiak, Dobra, PL

(54) Tytuł:

Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia receptora VEGF-R2 w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging

PL 249084 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor służący do specyficznego oznaczania stężenia receptora VEGF-R2 w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji Imaging.

Receptor VEGF-R2 (KDR/Flk-1) łącznie z białkiem sygnalizującym VEGF (*vascular endothelial growth factor*) stymuluje wzrost nowych naczyń krwionośnych (angiogenezę), które dostarczają krew (i tlen) do komórek i tkanek co jest powodem niedotlenienia (hipoksji). Jednym z powodów wystąpienia hipoksji jest gwałtowny wzrost tkanki nowotworowej. Różne typy nowotworów wytwarzają wysokie poziomy stężenia VEGF co czyni go jednym z ważniejszych czynników w procesie angiogenezy. Uaktywnienie VEGF następuje w wyniku jego przyłączenia do receptora VEGF-R2 powodując jego dimeryzację i transfosforyzację. Stała dysocjacji połączenia VEGF-R2 z VEGF, będąca miarą siły wiązania, wynosi $K_d = 4 \cdot 10^{-10} - 8 \cdot 10^{-10} \text{ mol/dm}^3$. [Rolf A. et al. *Cancer. Res.*, 2000: 60, 5117–5124.].

Obok VEGF-R2 występują jeszcze receptory VEGF-R1 i VEGF-R3, których rola jest mniejsza i nie całkowicie wyjaśniona. [Holmes K, et al. *Cell. Signal.*, 2007: 19(10), 2003–2012; Stutfeld E, et al. *IUBMB Life*, 2009: 61(9), 915–922; Fujita N, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008: 372(2), 367–372.].

Są liczne doniesienia o występowaniu VEGFR2 w komórkach rakowych, szczególnie raka piersi [Rydén L, Linderholm B, Nielsen NH, et al. *Tumor specific VEGF-A and VEGFR2/KDR protein are co-expressed in breast cancer*. *Breast Cancer Res Treatm.* 2003;82:147–154.][12. Ghosh S, Sullivan CAW, Zerkowski VIP, et al. *High levels of vascular endothelial growth factor and its receptors (VEFR-1, VEGFR-2, neuropilin-1) are associated with worse outcome in breast cancer*. *Hum Pathol.* 2008;39:1835–1843.], jelita grubego [Schimanski CC, Zimmermann T, Schmidtmann I, et al. *K-ras mutation status correlates with the expression of VEGFR1, VEGFR2, and PDGFRa in colorectal cancer*. *Int J Colorect Dis.* 2010;25:181–186.], płuc [Seto H, Higashiyama M, Funai H, et al. *Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage 1 non-small-cell lung cancer*. *Lung Cancer.* 2006;53:91–96], w traktcie moczowym [Xia G, Kumar SR, Hawes D, et al. *Expression and significance of vascular endothelial growth factor receptor 2 in bladder cancer*. *JUrol.* 2006;175:1245–1252.].

Aktualnie brakuje metod do oznaczeń VEGF-R2, natomiast w surowicy krwi jest oznaczany VEGF [Wang S. et al. *Anal. Lett.*, 2020: 54(7), 1233–1241.][Wang S.E., et al. *Anal. Methods.*, 2014: 6, 62–66.][Werther K., et al. *Scand J. Clin. Lab. Invest.*, 2002: 62(5), 343–350.].

Dlatego podjęto udaną próbę opracowania biosensora do oznaczania VEGFR2 oraz opartej na nim metody analitycznej. Zastosowano matrycową wersję techniki pomiarowej powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (imaging) (SPRi) współpracującej z biosensorem. W odróżnieniu od innych wersji techniki SPR, pomiar jest dokonywany bez kontaktu z roztworem a zastosowanie matrycy dużej liczby punktów pomiarowych poprawia precyzję wyniku. Ta wersja SPRi pozwala na oznaczanie różnych biomarkerów w płynach ustrojowych bez wzmacniania sygnału i wstępnego zatężania biomarkera.

Współpracując z biosensorem znalazła ona zastosowanie do oznaczania licznych istotnych biomarkerów znanych np. z dokumentów PL210052, PL222548, PL222549, PL223400, PL234329, PL234488, PL235044, PL235045, PL235043, PL36387, PL236773, P.432021 czy P.430495.

Rozwiązania te zostały opisane w szeregu publikacji naukowych, które zostały omówione na tle innych podobnych osiągnięć w pracach przeglądowych: [Gorodkiewicz E., Łukaszewski Z., *Recent Progress in Surface Plasmon Resonance Biosensors* (2016 to Mid-2018), *Biosensors*, 2018, 4, 132.][Falkowski P, Łukaszewski Z., Gorodkiewicz E., „*Potential of Surface Plasmon Resonance Biosensors in cancer detection*”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 194, 113802],

Co równie istotne, te biomarkery i metody analityczne znalazły zastosowanie w szeregu badań klinicznych opisanych w literaturze światowej: Laudański R, Gorodkiewicz E., Ramotowska B., Charkiewicz R., Kuzmicki M., Szamatowicz J. „*Determination of cathepsins B, D and G concentration in eutopic proliferative endometrium of women with endometriosis by surface plasmon resonance imaging (SPRI) technique*”, *European Journal of Obstetrics&Gynecology and Reproductive Biology*, 2013,169, 80, Gorodkiewicz E., Guszcz T., Roszkowska-Jakimiec W., Kozłowski R. „*Cathepsin D serum and urine concentration in superficial and invasive transitional bladder cancer as determined by surface plasmon resonance imaging.*”, *Oncology Letters*, 2014, 8,1323, Sankiewicz A., Guszcz T., Mena-Hortelano R., Zukowski K. and Gorodkiewicz E., „*Podoplanin serum and urine concentration in transitional bladder*

cancer”, *Cancer Biomarkers*, 2016, 16, 343–350, Weremijewicz A, Matuszczak E, Sankiewicz A, Tylicka M, Komarowska M, Tokarzewicz A, Debek W, Gorodkiewicz E, Hermanowicz A, „*Matrix metallo-proteinase-2 and its correlation with basal membrane components laminin-5 and collagen type IV in burn patients measured with Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) biosensors*,” *Burns*, 2018, 44, 931, Komarowska M., Szymańska B., Oldak L., Sankiewicz A., Matuszczak E., Gorodkiewicz E., Debek W., Milewski W., Hermanowicz A., *Plasma level of laminin 5 and collagen IV in cryptorchidism*, *Advances in Medical Sciences*, 2020, 65, 176–181; Matuszczak E., Tylicka M., Hermanowicz A., Debek W., Sankiewicz A. and Gorodkiewicz E. „*Application of SPR Imaging Biosensor for the Measurement of 20S Proteasomes in Blood Plasma of Children with Thermal Injury*”, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2016, 46, 4, 247–251, Matuszczak E., Tylicka M., Dębek W., Sankiewicz A., Gorodkiewicz E., Hermanowicz A., *Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) in serum of children after thermal injury*, *Advances in Medical Sciences* 62, 2017, 83–86, Matuszczak E., Tylicka M., Debek W., Tokarzewicz A., Gorodkiewicz E., Hermanowicz A., *Concentration of UHCL1 in the Serum of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRP and Prealbumin*, *Journal of Investigative Surgery*, 2018, 31(2), 136, Toliczenko-Bernatowicz D., Matuszczak E., Tylicka M., Szymańska B, Komarowska M., Gorodkiewicz E., Debek W., Hermanowicz A., „*Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) in boys with cryptorchidism*”, *PLoS ONE*, 2018, 13(2),1, Matuszczak E., Tylicka M., Debek W., Tokarzewicz A., Gorodkiewicz E., Hermanowicz A., *Concentration of UHCL I in the Serum of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRP and Prealbumin*, *Journal of Investigative Surgery*, 2017, 1–6, Matuszczak E., Sankiewicz A., Debek W., Gorodkiewicz E., Milewski R., Hermanowicz A., 2017, *Immunoproteasome in the blood plasma of children with acute appendicitis, and its correlation with proteasome and UCHL1 measured by SPR imaging biosensors*, *Clinical and Experimental Immunology*, 2017, 191(1): 125–132, Matuszczak E., Tylicka M., Debek W., Sankiewicz A., Gorodkiewicz E., Hermanowicz A., *Concentration of Proteasome in the Blood Plasma of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRP*, *World Journal of Surgery*, 2018, 42, 2259, Matuszczak E., Sankiewicz A. Gorodkiewicz E., Hermanowicz A., „*Determination of the concentration of cathepsin B by SPRI biosensor in children with appendicitis, and its correlation with proteasomes*” *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2018, 27, 11, 1529, Toliczenko-Bernatowicz D., Matuszczak E., Tylicka M., Sankiewicz A., Komarowska M., Gorodkiewicz E., Debek W., Hermanowicz A. „*20S proteasome in the blood plasma of boys cryptorchidism*” *Journal of Endocrinological Investigation*, 2018, 41(9): 1103–1106, czy Tokarzewicz A., Guszcz T., Onopiuk A., Kozłowski R., E. Gorodkiewicz, „*The utility of cystatin C as a potential bladder tumor biomarker confirmed by Surface Plasmon Resonance technique*”, *Indian Journal of Medical Research*, 2018, 147, 46.

Opracowany biosensor wykorzystuje monoklonalne królicze przeciwciało specyficzne na VEGF-R2 jako receptor i spełnia warunki analityczne pod względem zakresu pomiarowego, specyficzności, precyzji i dokładności pomiaru.

Biosensor według wynalazku zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwę receptorową tworzy wymienione wyżej przeciwciało zimmobilizowane na powierzchni złota wiązaniem kowalencyjnym za pośrednictwem linkera – cysteaminy.

Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia VEGF-R2 w płynach ustrojowych w przykładzie realizacji został przedstawiony na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat biosensora, a fig. 2 pokazuje krzywą kalibracyjną VEGF-R2 – zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia VEGF-R2.

Biosensor składa się z płytki szklanej 1 pokrytej warstwą złota 3 na podłożu tytanu 2 oraz siatkę polimeru 4 tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwa receptorowa składa się z linkera 5 – cysteaminy oraz monoklonalnego króliczego antyciała specyficznego na VEGF-R2 6 połączonego kowalencyjnie z linkerem. Warstwa receptorowa specyficznie wyłapuje VEGF-R2 7 z badanego roztworu.

Biosensor jest specyficzny w tym sensie, że wychwytuje tylko VEGF-R2 spośród setek innych substancji obecnych w płynach ustrojowych. Biosensor współpracujący z pomiarem SPRI zapewnia pomiary w zakresie stężeń dostosowanym do poziomu występującego w krwi i innych płynach ustrojowych. Odpowiedź biosensora jest liniowa – jak pokazuje fig. 2, co jest istotne dla dokładnego wyznaczenia wyniku. Biosensor zapewnia dobrą precyzję i dokładność pomiaru.

Biosensor w przykładzie działania został wykorzystany do oznaczania VEGF-R2 w serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzonym glejakiem mózgu oraz w serii próbek osocza krwi pochodzących od grupy kontrolnej, którą stanowili nałogowi palacze. Próbką osocza krwi pacjentów ze stwierdzonym glejakiem mózgu jest rozcieńczana buforem PBS w stosunku 1:1. Na jedno z aktywnych miejsc biosensora jest nanoszone 3 μ L tego roztworu. Po upływie 10 min próbka jest 6-krotnie przemywana buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRi. Stężenie VEGF-R2 odczytuje się z krzywej kalibracyjnej oraz uwzględnia rozcieńczenie.

Z serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzonym glejakiem mózgu otrzymano następujące wyniki:

| | | | | |
|---------------------------|----|-------------|----------|-------------------|
| Próbka 1 stadium choroby | G1 | sygnał SPRi | 1547,142 | wynik 1,980 ng/mL |
| Próbka 2 stadium choroby | G1 | sygnał SPRi | 1548,996 | wynik 1,983 ng/mL |
| Próbka 3 stadium choroby | G1 | sygnał SPRi | 1908,062 | wynik 2,593 ng/mL |
| Próbka 4 stadium choroby | G2 | sygnał SPRi | 1945,414 | wynik 2,657 ng/mL |
| Próbka 5 stadium choroby | G2 | sygnał SPRi | 1520,622 | wynik 1,934 ng/mL |
| Próbka 6 stadium choroby | G2 | sygnał SPRi | 1655,621 | wynik 2,164 ng/mL |
| Próbka 7 stadium choroby | G3 | sygnał SPRi | 1161,869 | wynik 1,325 ng/mL |
| Próbka 8 stadium choroby | G3 | sygnał SPRi | 1752,538 | wynik 2,329 ng/mL |
| Próbka 9 stadium choroby | G3 | sygnał SPRi | 1270,931 | wynik 1,510 ng/mL |
| Próbka 10 stadium choroby | G4 | sygnał SPRi | 1062,672 | wynik 1,156 ng/mL |
| Próbka 11 stadium choroby | G4 | sygnał SPRi | 1260,456 | wynik 1,492 ng/mL |
| Próbka 12 stadium choroby | G4 | sygnał SPRi | 1058,055 | wynik 1,148 ng/mL |

Próbki osocza krwi grupy kontrolnej są rozcieńczane buforem PBS w stosunku 1:2, a dalsze postępowanie jest analogiczne jak wyżej. Z serii próbek osocza krwi grupy kontrolnej otrzymano następujące wyniki:

| | | | |
|----------|-------------|----------|-------------------|
| Próbka 1 | sygnał SPRi | 1655,097 | wynik 2,163 ng/mL |
| Próbka 2 | sygnał SPRi | 1094,937 | wynik 1,211 ng/mL |
| Próbka 3 | sygnał SPRi | 972,059 | wynik 1,002 ng/mL |
| Próbka 4 | sygnał SPRi | 1353,066 | wynik 1,650 ng/mL |
| Próbka 5 | sygnał SPRi | 1670,172 | wynik 2,189 ng/mL |
| Próbka 6 | sygnał SPRi | 1518,041 | wynik 1,930 ng/mL |
| Próbka 7 | sygnał SPRi | 1348,584 | wynik 1,642 ng/mL |
| Próbka 8 | sygnał SPRi | 1276,788 | wynik 1,520 ng/mL |
| Próbka 9 | sygnał SPRi | 1665,299 | wynik 2,180 ng/mL |

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia receptora VEGF-R2 w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową **znamienny tym**, że warstwę receptorową stanowi monoklonalne królicze przeciwciało specyficzne na VEGF-R2 (6) połączone kowalencyjnie z linkerem (5), w postaci cysteaminą, łączącym receptor z warstwą złota (3), na podłożu z tytanu (2), pokrywającą płytkę szklaną (1).

Rysunki

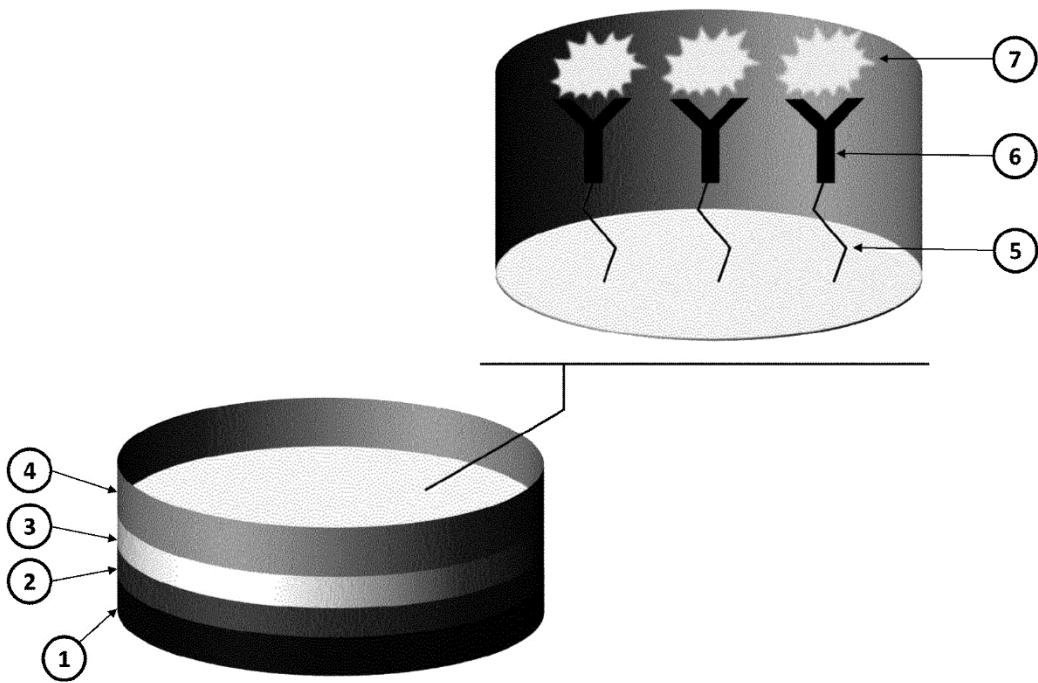


fig.1

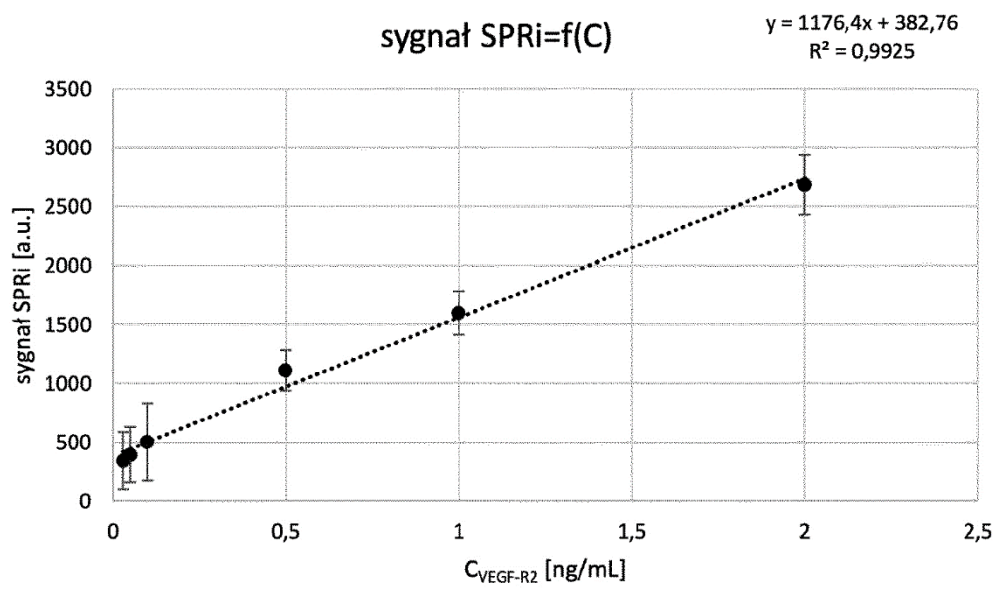


fig. 2