

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **235044**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **412412**

(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 kolagenu typu IV 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 235044 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do oznaczania kolagenu typu IV.

Kolagen jest główną częścią podstawy tkanki łącznej oraz najważniejszym białkiem w ciele człowieka. Stanowi on 1/3 masy wszystkich białek. Należy do rodziny białek kolagenowych, w której skład wchodzi, co najmniej 27 genetycznie odrębnych typów, które różnią się masą cząsteczkową i składem aminokwasowym. Kolagen typu IV jest głównym składnikiem błony podstawnej, która jest specyficznie zbudowaną warstwą macierzy pozakomórkowej. Stanowi mechaniczną podporę i barierę fizyczną dla komórki. Zarządza ona również szeregiem procesów przekazywania sygnałów pomiędzy zewnątrzkomórkowym środowiskiem a wnętrzem komórki i odwrotnie. Błona podstawna odgrywa ważną rolę w procesach nowotworowych. Jednym z etapów przerzutowania nowotworu jest niszczenie i naciekanie błon podstawnych oraz macierzy zewnątrzkomórkowej. Na skutek działania odpowiednich enzymów dochodzi do degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej i siateczki włókien kolagenowych przez co komórki nowotworowe mogą się rozprzestrzeniać. Kolagen jest syntetyzowany i odkładany podczas tworzenia naczyń krwionośnych wokół komórek endotelialnych i może być zatem uznawany jako marker aktywności procesu angiogenezy. Możliwość monitorowania ilości kolagenu wynikających z zaburzeń w procesie jego syntezy i degradacji pozwala na zrozumienie procesów związanych z powstawaniem, rozwojem i przebiegiem różnych chorób w tym nowotworowych [K.A. Czubak, H.M. Żbikowska, *Struktura, funkcja i znaczenie biomedyczne kolagenów*, *Ann.Acad.Med.Sites*, 2014,68,4,245–254, D.Öhlund, O.Franklin, E.Lundberg, C.Lundin, M.Sund, *Type IV collage stimulates panceratic cancer cell proliferation, migration and inhibits apoptosis through an autocrine loop*, *BMC Cancer*, 2013, 13:154].

Badano ekspresję kolagenu w różnych tkankach np. metodą Western Blot z detekcją chemiluminescencyjną [A.Goździalska, A.Gawędka, J.Drąg i inni, *Ekspresja kolagenu typu III i IV w nowotworach piersi*, *Przegląd Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego*, 2010, 2, 128–133]. Oznaczano również stężenie metodą immunoenzymatyczną [M.P. Cohen, C.W. Shearman, G.T. Lautenslager, *Serum type IV collagen in diabetic patients at risk for nephropathy*, *Diabetes Care*, 2001, 24, 1324–1327] oraz techniką ELISA [Ch.E. Wiedmeyer, A. Rogal, *Urinary biomarkers for monitoring disease progression in the Han:SPDR-cy rat model of autosomal-dominant polycystic kidney disease*, *Comaprative Medicine*, 2010, 60, 448–454].

Technika rezonansu powierzchniowego plazmonów (ang. 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 kolagenu typu IV z wykorzystaniem mysiego monoklonalnego przeciwciała specyficznego wobec kolagenu IV korzystnie techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów. Biosensor składa się ze szkła, 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 mysiego monoklonalnego przeciwciała specyficznego wobec kolagenu typu IV, poszczególne partycje biosensora rozdzielone są odpowiednim polimerem. Dzięki zastosowaniu rozwiązania według wynalazku uzyskuje się bardzo szybką analizę badanego materiału na stężenie kolagenu typu IV.

Przedmiot wynalazku uwidoczniony jest na rysunku, na którym Fig. 1 przedstawia przekrój pionowy przez biosensor, natomiast Fig. 2 przedstawia otrzymaną krzywą kalibracyjną do oznaczania kolagenu IV.

Biosensor składa się ze szkiełka (1) oraz czterech warstw. Spodnią warstwę biosensora stanowi chrom (3), na który nałożone jest złoto (2), następnie tiolowy linker (4) oraz warstwa mysiego monoklonalnego przeciwciała specyficznego wobec kolagenu typu IV (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 mysiego monoklonalnego przeciwciała specyficznego na kolagen typu IV w zakresie stężeń 20–300 ng/ml. Na poszczególne pola sensora zawierające dużą liczbę miejsc aktywnych np. 12, nakłada się wzorec kolagenu IV tak aby uzyskać stężenia 20, 30, 50, 100, 150, 200, 300 ng/ml. Stężenia te odpowiadają prostoliniowemu odcinkowi krzywej kalibracyjnej kolagenu IV. Na wolne pola nakłada się próbki osocza.

Nie rozcieńczane próbki osocza nanoszone są na powierzchnię sensora na 10 minut. Objętość przenieszonego roztworu jest ok. 3 μ l. Powierzchnia sensora jest przemywana co najmniej sześciokrotnie buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRI. Stężenie kolagenu IV odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

P r z y k ł a d: Oznaczenie stężenia kolagenu IV w próbkach osocza zdrowych dawców

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

1. 1670
2. 1714
3. 1531
4. 1488
5. 1585
6. 1758
7. 1466
8. 1602
9. 1686
10. 1613
11. 1396
12. 1746

Odczytane z krzywej stężenia kolagenu IV wynoszą odpowiednio (w ng/ml):

1. 92,9
2. 97,0
3. 79,9
4. 75,8
5. 84,9
6. 101,1
7. 73,8
8. 86,5
9. 94,4
10. 87,5
11. 67,3
12. 100,0

Średnie stężenie wynosi 86,8 ng/mL.

Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ wynosi 6,1.

Średni wynik określono $(86,8 \pm 6,1)$ ng/mL.

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do oznaczania kolagenu typu IV z wykorzystaniem mysiego monoklonalnego przeciwciała specyficznego na kolagen typu IV 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 mysie monoklonalne przeciwciało specyficzne wobec kolagenu typu IV (5).

Rysunki

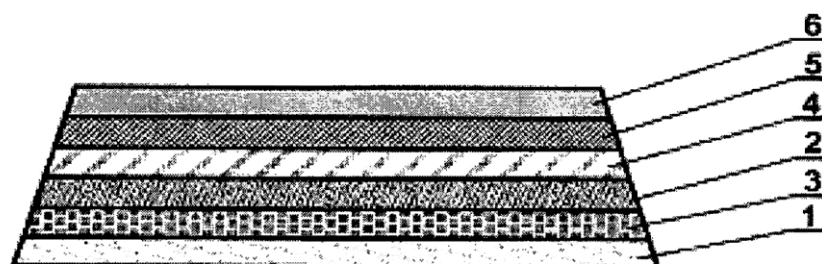


Fig. 1

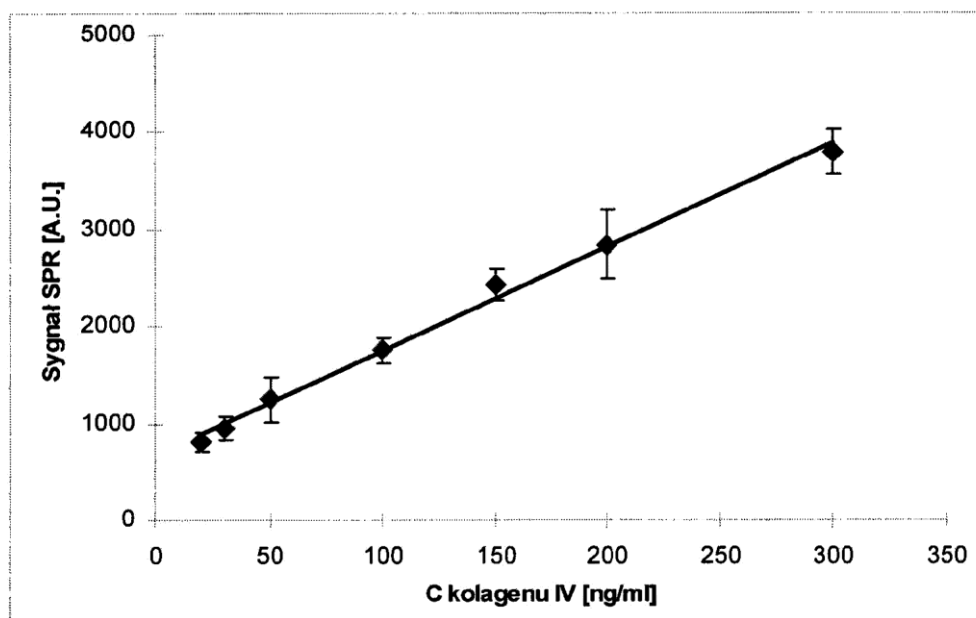


Fig. 2