

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **241404**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432625**

(22) Data zgłoszenia: **20.01.2020**

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

(54) **Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia ludzkiego białka
z komórek nabłonkowych najądrza 4 (HE 4)**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
26.07.2021 BUP 17/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
26.09.2022 WUP 39/22

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL
UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
BEATA SZYMAŃSKA, Krasne Małe, PL
BOGDAN WYRWAS, Poznań, PL
ZENON ŁUKASZEWSKI, Kamionki, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Walkowiak

PL 241404 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania podfrakcji 4 ludzkiego białka z komórek nabłonkowych najądrza (HE4) w płynach ustrojowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging.

HE 4 jest markerem stosowanym w diagnostyce raka jajnika. Jest to marker bardziej specyficzny dla raka jajnika niż równolegle stosowany marker CA125/MUC 16 [Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. "The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass.", *Gynecologic Oncology*, 2008, 108, 402–8; Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. "Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases.", *Clinical Chemistry*, 2011, 57, 1534–44; Lenhard M, Stieber P, Hertlein L, et al. "The diagnostic accuracy of two human epididymis protein 4 (HE4) testing systems in combination with CA125 in the differential diagnosis of ovarian masses." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2011, 49, 2081–8.].

HE 4 jest wytwarzany nie tylko przez złośliwe, ale także zdrowe tkanki (tchawicę, ślinianki, płuca, tarczycę i prostatę), jednak najwyższe stężenia HE4 stwierdzono w nabłonkowym raku jajnika [Hertlein L, Stieber P, Kirschenhofer A, et al. "Human epididymis protein 4 (HE4) in benign and malignant diseases." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2012, 50, 2181–8., Bast Jr RC, Xu FJ, Yu YH, Barnhill S, Zhang Z, Mills GB. "CA125: the past and the future.", *The International Journal of Biological Markers*, 1998, 13, 179–87].

Progowe stężenie HE 4 w osoczu krwi (wartość cut-off) jest określone na 70 picomoli/L (1,75 ng/mL). Im wyższe stężenie powyżej tej progowej wartości tym większe prawdopodobieństwo występowania raka jajnika. [Ying Xu, Rihui Zhong, JianHe, Rui Ding, Haixiong Lin, Yawen Deng, Lijun Zhou, Xiaohui Li, Junyi Jiang, Yunwen Bao, Xiaohong Luo, Chaohui Duan, *Modification of cut-off values for HE4, CA125 and the ROMA algorithm for early-stage epithelial ovarian cancer detection: Results from 1021 cases in South China*, *Clinical Biochemistry* 2016, 49, 32–40].

HE4 ma znacznie wyższą czułość w raku jajnika w stadium I niż CA125/MUC16. [Urban N, Thorpe JD, Bergan LA, et al. "Potential role of HE4 in multimodal screening for epithelial ovarian cancer.", *Journal of the National Cancer Institute*, 2011, 103, 1630–4].

W łagodnych chorobach jajników w przypadku HE 4 rzadziej obserwuje się błędnie pozytywne wskazania niż w przypadku markera CA125/MUC16 [Wang K, Gan L, Jeffery E, et al. "Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray.", *Gene*, 1999, 229, 101–8]. Czułość HE 4 wynosiła 76% u kobiet w okresie przedmenopauzalnym i 92% w okresie pomenopauzalnym przy swoistości 75% [Moore R.G., McMeekin D.S., Brown A.K., et al. "A novel multiplex marker bioassay utilizing HE 4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass." *Gynecologic Oncology* 2009, 112, 40–46].

Oprócz diagnostycznego stosowania wartości stężenia HE4 w osoczu krwi, ten marker jest także wykorzystywany do wyznaczania algorytmu ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm), w skład którego wchodzi markery HE 4 i CA125/MUC 16 a który często daje lepsze wyniki diagnostyczne, niż te markery stosowane oddzielnie [Ying Xu, Rihui Zhong, JianHe, Rui Ding, Haixiong Lin, Yawen Deng, Lijun Zhou, Xiaohui Li, Junyi Jiang, Yunwen Bao, Xiaohong Luo, Chaohui Duan, *Modification of cut-off values for HE4, CA125 and the ROMA algorithm for early-stage epithelial ovarian cancer detection: Results from 1021 cases in South China*, *Clinical Biochemistry* 2016, 49, 32–40], HE 4 jest cząsteczką wielkości 25 kDa.

HE 4 jest oznaczane za pomocą metody elektrochemicznego testu immunologicznego typu sandwich [Lingsong Lu, Bei Liu, Jianhang Leng, Keyi Wang, Xiao Ma, Shun W u *Electrochemical sandwich immunoassay for human epididymis-specific protein 4 using a screen-printed electrode modified with graphene sheets and gold nanoparticles, and applying a modular magnetic detector device produced by 3D laser sintering*, *Microchimica Acta*, Volume 183, pp 837–843] a także przy użyciu metody elektrochemiluminescencyjnej oraz testów ELISA (J. Wu, Z. Fu, F. Yan, H. Ju, *Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers*. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007: 26).

Alternatywną możliwością oznaczania białka z komórek nabłonkowych najądrza 4 (HE 4) jest zastosowanie biosensora i techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging) (SPRi). Została ona przedstawiona m.in. w pracach: A. Sankiewicz, L. Romanowicz, P. Laudanski, B. Zelazowska-Rutkowska, B. Puzan, B. Cylik, E. Gorodkiewicz, *SPR imaging biosensor for determination of laminin-5 as a potential cancer marker in biological material*, *Anal Bioanal Chem.* 2016; 408:

5269–5276; A. Sankiewicz, Z. Lukaszewski, K. Trojanowska, E. Gorodkiewicz, *Determination of collagen type IV by Surface Plasmon Resonance Imaging using a specific biosensor*, *Anal Biochem.* 2016; 515: 40–46; A. Sankiewicz, A. Markowska, Z. Lukaszewski, B. Puzan, E. Gorodkiewicz, *Methods for 20S Immunoproteasome and 20S Constitutive Proteasome Determination Based on SPRI Biosensors*, *Cell Molec Bioengin.* 2017; 10: 174–185.40–46; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Gorodkiewicz, *The development of a matrix metalloproteinase-1 biosensor based on the surface plasmon resonance imaging technique*, *Anal Methods.* 8(2016) 6428–6435; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Matuszczak, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz, *SPRI biosensors for quantitative determination of matrix metalloproteinase-2*, *Anal Methods.* 9(2017) 2407–2414; A. Sankiewicz, L. Romanowicz, M. Pyc, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz, *SPR imaging biosensor for the quantitation of fibronectin concentration in blood samples*, *J Pharmac Biomed. Anal.* 150(2018)1–8; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, A. Sankiewicz, A. Hermanowicz, K. Sobolewski, E. Gorodkiewicz, *A New Analytical Method for Determination of Cathepsin L Based on the Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensor*, *Int J Mol Sci.* 20(2019)2166.

Zastosowanie bioanalityczne SPRI przedstawiają m.in. publikacje: A. Sankiewicz, T. Guszcz, R. Mena-Hortelano, K. Zukowski, E. Gorodkiewicz E, *Podoplanin serum and urine concentration in transitional bladder cancer*, *Cancer Biomark.* 2016; 16: 343–350; E. Matuszczak, M. Tylicka, A. Hermanowicz, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, *Application of SPR imaging biosensor for the measurement of 20S proteasomes in blood plasma of children with thermal injury*, *Annal Clin Lab Sci.* 2016; 46: 407–411; A. Tokarzewicz, T. Guszcz, A. Onopiuk, R. Kozłowski, E. Gorodkiewicz, *Utility of cystatin C as a potential bladder tumour biomarker confirmed by surface plasmon resonance technique*, *Indian J A Med Res.* 2018; 218: 46–50; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) in serum of children after thermal injury*, *Adv Med Sci.* 2017; 62: 83–86; A. Weremijewicz, E. Matuszczak, A. Sankiewicz, M. Tylicka, M. Komarowska, A. Tokarzewicz et al., *Matrix metalloproteinase-2 and its correlation with basal membrane components laminin-5 and collagen type IV in paediatric burn patients measured with Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) biosensors*, *Burns*, 2018; 44: 931–940; D.Toliczenko-Bernatowicz, E. Matuszczak, M. Tylicka, B. Szymańska, M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, et al. *Over expression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) in boys with cryptorchidism*, *Plos One*, 2018; 13: e0191806; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Concentration of Proteasome in the Blood Plasma of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRP*, *World J Surg.* 2018; 42: 2259–2264; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Tokarzewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Concentration of UHCL1 in the Serum of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRP and Prealbumin*, *J Investig Surg.* 2018; 31: 136–141; D. Toliczenko-Bernatowicz, E. Matuszczak, M. Tylicka, A. Sankiewicz, M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, et al. *20S proteasome in the blood plasma of boys with cryptorchidism*, *J Endocrinol Investig.* 2018; 41: 1103–1106; E. Matuszczak, A. Sankiewicz, W. Debek, E. Gorodkiewicz, R. Milewski, A. Hermanowicz, *Immunoproteasome in the blood plasma of children with acute appendicitis, and its correlation with proteasome and UCHL1 measured by SPR imaging biosensors*, *Clin Exper Immun.* 2018; 191: 125–132; E. Matuszczak, M. Komarowska, M. Tylicka, W. Debek, E. Gorodkiewicz, A. Tokarzewicz, et al, *Determination of the concentration of cathepsin B by SPR1 biosensor in children with appendicitis, and its correlation with proteasomes*, *Adv Clin Exp Med.* 2018; 27:1529–1534, R. Grzywa, E. Gorodkiewicz, E. Burchacka, A. Lesner, P. Laudanski, Z. Lukaszewski, M. Sienczyk, *Determination of cathepsin G in endometrial tissue using a surface plasmon resonance imaging biosensor with tailored phosphonic inhibitor*, *Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol.* 2014;182: 38–42; P. Laudanski, E. Gorodkiewicz, B. Ramotowska, R. Charkiewicz, M. Kuzmicki, J. Szamatowicz, *Determination of cathepsins B, D and G concentration in eutopic proliferative endometrium of women with endometriosis by the surface plasmon resonance imaging (SPRI) technique*, *Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol.* 2013; 169: 80–83.

Biosensor wychwytuje wyłącznie oznaczaną substancję z roztworu, a aparatura SPRI reaguje na przyrost masy na powierzchni biosensora i przekształca go w sygnał analityczny. Rozwiązanie takie charakteryzuje prostota zarówno wykonania biosensora, jak i przeprowadzenia procesu pomiarowego. Dlatego rozwiązanie to może konkurować z obecnie stosowanymi metodami oznaczania substancji biologicznie aktywnych. Według obecnego stanu techniki istnieją liczne biosensory SPRI umożliwiające oznaczania stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy

PL223400, PL210052, PL222548, PL417435 czy też PL422096. Dotychczas jednak nie opracowano biosensora SPRi do oznaczania HE 4.

Podstawowe założenie i wiedza o tym, że wartości stężenia HE4 w osoczu krwi stanowią marker stosowanym w diagnostyce raka jajnika, było w toku prac nad wynalazkiem punktem wyjścia do podjęcia projektu opracowania biosensora współpracującego z techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging. W czasie trwania prac badawczo-rozwojowych nad wynalazkiem konieczne było:

- znalezienie odpowiedniego linkera na podstawie wiedzy o budowie chemicznej antyciała;
- doświadczalne sprawdzenie czy antyciało immobilizuje się na powierzchni złota (mikroskop sił atomowych, lub rentgenowski mikroskop skaningowy);
- doświadczalne sprawdzenie czy zimmobilizowane antyciało wychwytuje skutecznie HE 4;
- doświadczalne sprawdzenie czy zimmobilizowane antyciało wychwytuje skutecznie tylko HE 4;
- optymalizacja warunków działania biosensora;
- doświadczalne sprawdzenie czy wytworzony biosensor tworzy sygnał analityczny użyteczny do ilościowej analizy (zakres stężeń, liniowość sygnału analitycznego)
- zbadanie precyzji i dokładności odpowiedzi analitycznej.

Mając powyższe na uwadze dobór właściwej warstwy receptorowej wynik prac cechował się nieoczywistością.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania HE 4 w płynach ustrojowych (osocze lub surowica krwi, mocz) lub homogenatach tkankowych dostosowany do współpracy z techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging). Opracowany biosensor wykorzystuje poliklonalne królicze przeciwciało specyficzne wobec HE 4 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 HE 4 w płynach ustrojowych w przykładzie realizacji został przedstawiony na rysunku na którym fig. 1 i 2, przedstawiają schemat biosensora, a fig. 3 pokazuje krzywą kalibracyjną HE 4 – zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia HE 4.

Biosensor (fig. 2) składa się z płytki szklanej (1) pokrytej warstwą złota (3) na podłożu chromu (2) oraz siatki polimeru (4) tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwa receptorowa składa się z linkera – cysteaminy (5) oraz poliklonalnego króliczego antyciała specyficznego wobec HE 4 (6), połączonego kowalencyjnie z linkerem. Warstwa receptorowa specyficznie wychwytuje HE 4 (7) z badanego roztworu.

Biosensor jest specyficzny w tym sensie, że wychwytuje tylko marker HE 4 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 (fig. 3), co jest istotne dla dokładnego wyznaczenia wyniku. Biosensor zapewnia dobrą precyzję i dokładność pomiaru.

Biosensor w przykładzie działania został wykorzystany do oznaczania HE 4 w serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzonym rakiem jajnika. 3 μ L próbka osocza krwi jest nanoszona na jedno z aktywnych miejsc biosensora. Po upływie 10 min próbka jest 6-krotnie przemywana buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRi. Stężenie HE 4 odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

Z serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzonym rakiem jajnika otrzymano następujące wyniki:

Próbka 1	sygnał SPRi	3249,3	wynik 54,2 ng/mL
Próbka 2	sygnał SPRi	3713,9	wynik 62,6 ng/mL
Próbka 3	sygnał SPRi	1981,7	wynik 31,5 ng/mL
Próbka 4	sygnał SPRi	3740,1	wynik 63,3 ng/mL
Próbka 5	sygnał SPRi	3348,9	wynik 56,0 ng/mL
Próbka 6	sygnał SPRi	1576,4	wynik 24,2 ng/mL
Próbka 7	sygnał SPRi	2684,1	wynik 44,1 ng/mL
Próbka 8	sygnał SPRi	2532,8	wynik 41,4 ng/mL
Próbka 9	sygnał SPRi	1512,2	wynik 23,1 ng/mL

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia ludzkiego białka z komórek nabłonkowych najądrza 4 (HE 4) w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota na podłożu chromu oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową **znamienny tym**, że warstwę receptorową stanowi poliklonalne królicze antyciało specyficzne wobec na-HE 4 (6) połączone kowalencyjnie z linkerem (5), w postaci cysteaminy, łączącym receptor z warstwą złota (3) pokrywającą płytkę szklaną (1) poprzez podłoże chromowe (2).

Rysunki

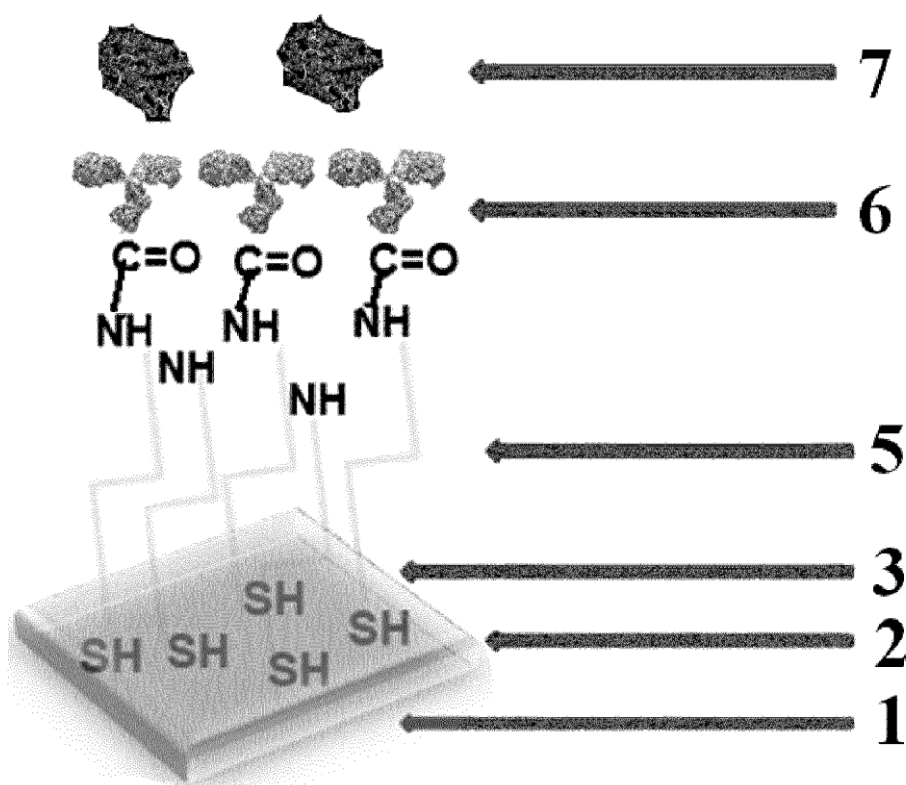


fig. 1

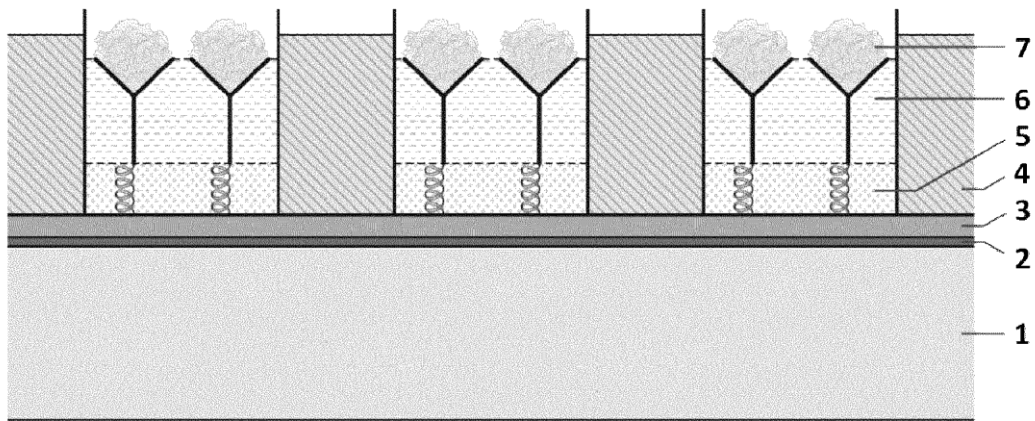


fig. 2

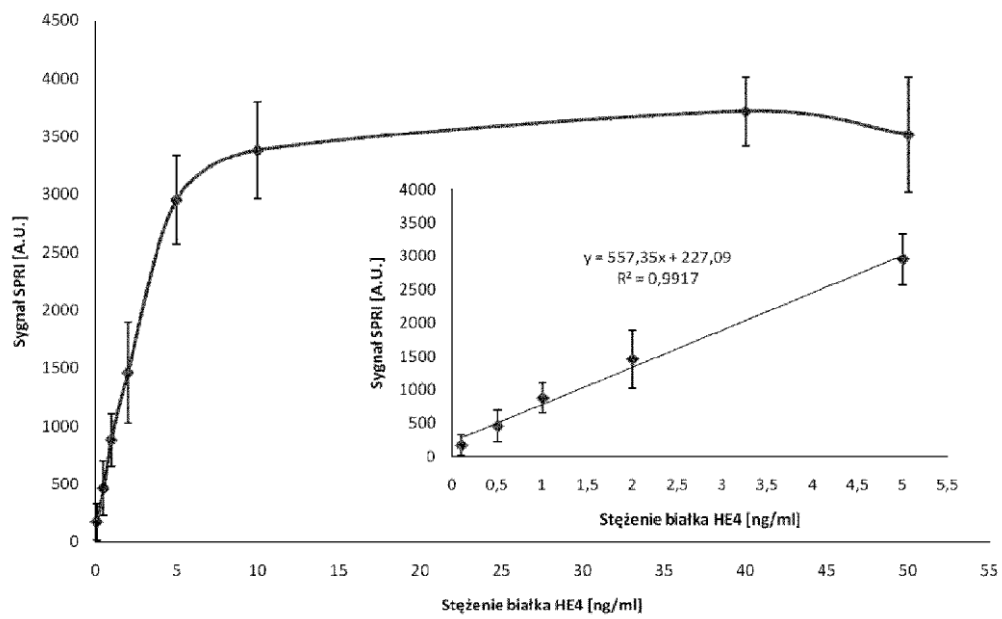


fig. 3