

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **234488**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **417435**

(22) Data zgłoszenia: **04.06.2016**

(51) Int.Cl.

G01N 21/55 (2014.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(54) **Biosensor do oznaczania immunoproteasomu 20S z wykorzystaniem inhibitora**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
18.12.2017 BUP 26/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.03.2020 WUP 03/20

(73) Uprawniony z patentu:
**UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL**

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

PL 234488 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do oznaczania immunoproteasomu z wykorzystaniem inhibitora ONX-0914.

Immunoproteasom jest białkowym, wielkocząsteczkowym kompleksem enzymatycznym.

Jest jedną z form proteasomu, który odgrywa ważną rolę w procesie proteolitycznej degradacji białek i jest głównym elementem szlaku ubiquityna-proteasom (UPS). Wytwarzany jest w odpowiedzi na działanie interferonu-gamma (INF- γ), który indukuje syntezę immunopodjednostek. Na skutek działania INF- γ immunopodjednostki $\beta 1i$, $\beta 2i$ i $\beta 5i$ wbudowują się w nowo tworzący się proteasom w miejsce 3 aktywnych enzymatycznie, konstytutywnych jednostek $\beta 1$, $\beta 2$ oraz $\beta 5$ zmieniając jego aktywność hydrolityczną.

(Yewdell JW. *Immunoproteasomes: regulating the regulator*. *Proc Natl AcadSci USA*. 2005;102(26): 9089–90

Bury M., Niemierko A., *Proteasomalna degradacja białek komórkowych*. *Postępy biologii komórki*, 2005, 322(3), 435–48

Huber E.M., Basler M., Schwab R., Heinemeyer W., Kirk C.J., Groettrup M., Groll M. *Immuno- and constitutive proteasome crystal structures reveal differences in substrate and inhibitor specificity*. *Cell*. 2012;148(4):727–38

Ferrington DA, Gregerson DS. *Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation*. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;109:75–112

Nathan JA, Spinnenhirn V., Schmidtke G., Basler M., Groettrup M., Goldberg AL. *Immuno- and constitutive proteasomes do not differ in their abilities to degrade ubiquitinated proteins*.

Cell. 2013. 152(5): 1184–94

Zanker D, Chen W. *Standard and immunoproteasomes show similar peptide degradation specificities*, *Eur J Immunol*. 2014, 44(12):3500–3).

Odpowiada on za tworzenie peptydów prezentowanych limfocytom T przez cząsteczki MHC klasy I.

Odgrywa ważną rolę w procesie rozpoznawania immunologicznego i eliminacji zmienionych komórek, co ma znaczenie w rozwoju różnych chorób a zwłaszcza nowotworu.

(Ferrington DA, Gregerson DS. *Immunoproteasomes: structure, function, and antigen presentation*. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;109:75–112.

Angeles AI, Fung G, Luo H. *Immune and non-immune functions of the immunoproteasome*. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012 Jan 1;17:1904–16.

Basler M, Kirk CJ, Groettrup M. *The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions*. *Curr Opin Immunol*. 2013, 25(1):74–80.

Bellavista E., Andreoli F., Parenti MD, Martucci M., Santoro A., Salvioli S., Capri M., Baruzzi A., Del Rio A., Franceschi C., Mishto M., *Immunoproteasome in cancer and neuropathologies: a new therapeutic target?*, *Curr Pharm Des*, 2013;19(4):702–18.

Niewerth Di, Franke NE, Jansen G., Assaraf YG, van Meerloo J., Kirk CJ, Degenhardt J., Anderl J, Schimmer AD, Zweegman S, de Haas V, Horton TM, Kaspers GJ, Cloos J. *Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors*. *Haematologica*. 2013, (12):1896–904.

Miller ZI, Ao L, Kim KB, Lee W *Inhibitors of the immunoproteasome: current status and future directions*. *Curr Pharm Des*. 2013;19(22):4140–51.

McCarthy MK, Weinberg JB. *The immunoproteasome and viral infection: a complex regulator of inflammation*. *Front Microbiol*. 2015: 6:21.).

Prawidłowe funkcjonowanie szlaku UPS umożliwia zachowanie homeostazy procesów wewnątrzkomórkowych i usunięcie uszkodzonych białek. Oznaczenie stężenia immunoproteasomu i porównanie ze stężeniem proteasomu konstytutywnego pozwoli na poszerzenie wiedzy o działaniu systemu UPS i powiązaniu jego aktywności z ważnymi procesami biochemicznymi, które mogą mieć znaczenie w patogenezie nowotworów i innych schorzeń degeneracyjnych.

Immunoproteasom 20S był izolowany i oczyszczany techniką chromatograficzną a jego podjednostki oznaczano metodą LC-MS.

(Dechavanne V, Vilbois F, Giez L, Antonsson B. *Purification and separation of the 20S immunoproteasome from the constitutive proteasome and identification of the subunits by LC-MS*. *Protein Expr Purif*. 2013, 87(2): 100–110.).

Oznaczanie immunoproteasomu prowadzono techniką immunohistochemiczną oraz Western Blot

(Vasuri F, Capizzi E, Bellavista E, Mishto M, Santoro A, Fiorentino M, Capri M, Cescon M, Grazi GL, Grigioni WF, D'Errico-Grigioni A, Franceschi C. *Studies on immunoproteasome in human liver. Part I: absence in fetuses, presence in normal subjects, and increased levels in chronic active hepatitis and cirrhosis. Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jun 25;397(2):301–306.

Oh KI, Seo JN. *Expression pattern of immunoproteasome subunits in human thymus. Immune Netw.* 2009 Dec;9(6):285–288).

Do ilościowego oznaczania immunoproteasomu oraz jego immunopodjednostek wykorzystywano technikę ELISA.

(Roccaro AM, Sacco A, Aujay M, Ngo HT, Azab AK, Azab F, Quang P, Maiso P, Runnels J, Anderson KC, Demo S, Ghobrial IM. *Selective inhibition of chymotrypsin-like activity of the immunoproteasome and constitutive proteasome in Waldenstrom macroglobulinemia. Blood.* 2010 May 20;115(20):4051–4060.

Orre M, Kamphuis W, Dooves S, Kooijman L, Chan ET, Kirk CJ, Dimayuga Smith V, Koot S, Mamber C, Jansen AH, Ovaa H, Hol EM. *Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease, Brain,* 2013, 136(Pt 5):1415–1431.

Niewerth DI, Franke NE, Jansen G, Assaraf YG, van Meerloo J, Kirk CJ, Degenhardt J, Anderl J, Schimmer AD, Zweegman S, de Haas V, Horton TM, Kaspers GJ, Cloos J. *Higher ratio immune versus constitutive proteasome level as novel indicator of sensitivity of pediatric acute leukemia cells to proteasome inhibitors. Haematologica.* 2013, (12):1896–1904.).

Technika rezonansu powierzchniowego plazmonów (Surface Plasmon Resonance Imaging) jest niezwykle skutecznym narzędziem do oznaczania biologicznie aktywnych związków, została przedstawiona m.in. (HJ Lee, Y Yan, G Marriott, RM Corn, *Quantitative functional analysis of protein complexes on surfaces. J Physiol,* 2005, 563, 61–71, HJ Lee, D Nedelkov, RM 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, AW Wark, RM 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 umożliwiający specyficzne oznaczanie immunoproteasomu 20 S techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging. Biosensor składa się ze szkła, korzystnie typu BK7 oraz czterech warstw, na które nałożona jest siatka polimeru dzieląca sensor na partycje. Spodnią warstwę biosensora stanowi chrom, na który nałożone jest złoto, korzystnie o grubości 50 nm, a następnie tiolowy linker, korzystnie okta-decyliol. Warstwę wierzchnią biosensora (receptor) stanowi inhibitor immunoproteasomu ONX-0914.

Dzięki zastosowaniu rozwiązania według wynalazku uzyskuje się bardzo szybką analizę badanego materiału, w tym: osocza, surowicy, moczu, płynów mózgowo-rdzeniowych, homogenatów tkanek.

Przedmiot wynalazku uwidoczniiony jest na rysunkach, na którym Rys. 1 przedstawia przekrój pionowy przez biosensor, a Rys. 2 przedstawia zakres prostoliniowy krzywej kalibracyjnej immunoproteasomu. Biosensor składa się ze szkła (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 inhibitor immunoproteasomu ONX-0914 (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 (2), monowarstwy tiolu (4) np. okta-decyliolu, a na niej utworzenie monowarstwy inhibitora immunoproteasomu ONX-0914 (5) w zakresie stężeń 0,5–50 µg/ml z plateau otrzymanej krzywej odczytuje się stężenie inhibitora, przy którym następuje maksymalne wysycenie powierzchni biosensora. Na poszczególne pola sensora zawierające dużą

liczbę miejsc aktywnych np. 12, nakłada się wzorzec immunoproteasomu 20S tak, aby uzyskać stężenia 1,4; 2,1; 2,8; 4,2; 5,6; 7,0 $\mu\text{g/ml}$. Stężenia te odpowiadają prostoliniowemu odcinkowi krzywej kalibracyjnej immunoproteasomu. Na wolne pola nakłada się próbki osocza.

Dziesięciokrotnie rozcieńczone próbki osocza nanoszone są na powierzchnię sensora na 10 minut. Objętość przenoszonego roztworu wynosi ok. 3 μl . Powierzchnia sensora jest przemywana co najmniej sześciokrotnie buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRI. Stężenie immunoproteasomu 20S odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

Przykład: Oznaczenie stężenia immunoproteasomu 20S w próbce osocza zdrowych dawców oraz pacjentów z nowotworami krwi.

Z próbki osocza osoby z nowotworem krwi otrzymano następujące wartości intensywności sygnału SPRI dla poszczególnych miejsc aktywnych:

1. 3450,8
2. 3006,0
3. 3531,2
4. 2921,1
5. 4184,6
6. 4305,6
7. 4051,4
8. 4195,9
9. 3912,9
10. 3424,3
11. 3216,2
12. 3449,7

Odczytane z krzywej stężenia immunoproteasomu 20S po uwzględnieniu dziesięciokrotnego rozcieńczenia wynoszą odpowiednio ($\mu\text{g/ml}$):

1. 48,1
2. 41,9
3. 49,2
4. 40,7
5. 58,3
6. 60,0
7. 56,5
8. 58,5
9. 54,5
10. 47,7
11. 44,8
12. 48,1

Średnie stężenie wynosi 50,7 $\mu\text{g/ml}$.

Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ wynosi 4,4 $\mu\text{g/ml}$.

Średni wynik określono jako 50,7 $\pm$ 4,4 $\mu\text{g/ml}$.

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do oznaczania immunoproteasomu 20S 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 inhibitor immunoproteasomu ONX-0914 (5).

Rysunki

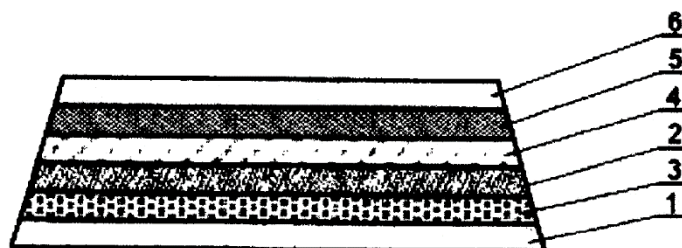


Fig. 1

Fig.1 przekrój pionowy przez biosensor

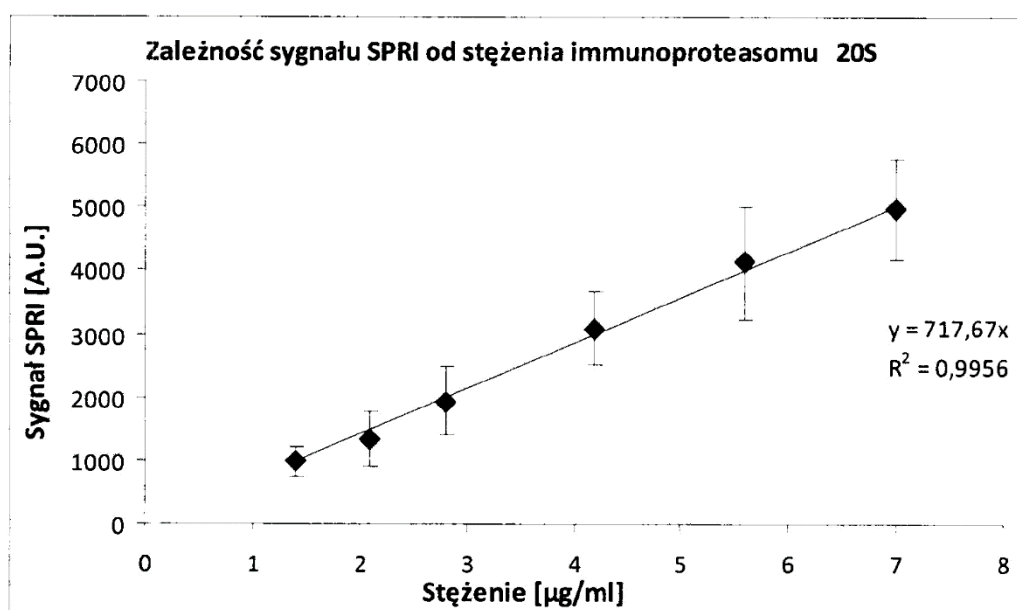


Fig. 2 krzywa kalibracyjna immunoproteasomu 20S