

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 247216 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **444477**

(22) Data zgłoszenia: **2023.04.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.10.21 BUP 43/2024**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.06.02 WUP 22/2025**

(51)

MKP:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU,
Białystok, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ANNA SANKIEWICZ, Białystok, PL
EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Walkowiak, Dobra, PL

(54) Tytuł:

**Biosensor do oznaczania hormonu folikulotropowego FSH techniką matrycowego
powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging**

PL 247216 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do oznaczania hormonu folikulotropowego FSH techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging.

Hormon folikulotropowy FSH (*follicle-stimulating hormone*) reguluje procesy reprodukcyjne, w tym dojrzewanie płciowe w organizmie (J. G. Pierce, T. F. Parsons, *Glycoprotein Hormones: Structure and Functions*, Ann.Rev.Biochem., 1981, 50, 465–495). Wspólnie z hormonem lutenizującym, FSH pobudza dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych u kobiet oraz kontroluje aktywność jąder u mężczyzn.

Wysoki poziom FSH w krwi kobiet w okresie pomenopauzalnym powoduje uderzenie gorąca i nocne poty, oraz zwiększony poziom cholesterolu LDL (Onizuka, Y., Nagai, K., Ideno, Y., Kitahara, Y., Iwase, A., Yasui, T., Nakajima-Shimada, J., Hayashi, K., *Association between FSH, E1, and E2 levels in urine and serum in premenopausal and postmenopausal women*, Clinical Biochemistry, 2019, 73, 105–108.) a także osteoporozę (Antonio, L., Priskorn, L., Olesen, I.A., Petersen, J.H., Vanderschueren, D., Jorgensen, N., *High serum FSH is not a risk factor for low bone mineral density in infertile men*, Bone, 2020, 136, 115366).

Hormon FSH jest pomocny przy określeniu płodności chłopców z wewnątrzrostwem (wadą rozwojową), co pozwala uniknąć biopsji jąder, uważanej za niebezpieczną (Hildorf, S.E., Clasen-Linde, E., Cortes, D., Fossum, M., Thorup, J., *The positive predictive value of using FSH and Inhibin-B serum levels to diagnose gonadotropin insufficiency in bilateral cryptorchid boys is high*, Journal of Pediatric Urology (2022) 18, 844. e1-844.e7.)

FSH jest dimeryczną glikoproteiną składającą się z podjednostki α zbudowanej z 92 aminokwasów oraz podjednostki β zawierającej 111 aminokwasów (Rose, M., P., Gaines Das, R., E., Balen, A., H., *Definition and measurement of follicle stimulating hormone*, Endocrine Reviews, 2000, 21(1), 5–22.), a każda z podjednostek jest połączona z fragmentem cukrowym w dwóch miejscach. Taka budowa powoduje, że FSH występująca w krwi jest mieszaniną molekuł o różnych masach cząsteczkowych. Fakt ten jest przyczyną niejednoznaczności wyników oznaczania FSH w krwi, które zależą od wybranego wzorca FSH oraz metody oznaczania.

Poziom FSH mierzy się w jednostkach aktywności. W przypadku stosowania rekombinatu FSH jako wzorca międzynarodowa jednostka aktywności FSH 1IU odpowiada masie 70 pg FSH (*Educational Bulletin, Gonadotropin preparations: past, present, and future: Perspectives*, Fertility and Sterility_ Vol. 90, Suppl 3, November 2008, S13-S20, doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.031). Trzeba mieć świadomość, że każdy wzorzec FSH powinien mieć swój własny równoważnik IU i masy FSH.

Literatura raportuje o różnych stężeniach w surowicy krwi: u kobiet w okresie przedmenopauzalnym $21,8 \pm 28,4$ IU/L i $55,7 \pm 29,4$ IU/L w okresie pomenopauzalnym (Onizuka, Y., Nagai, K., Ideno, Y., Kitahara, Y., Iwase, A., Yasui, T., Nakajima-Shimada, J., Hayashi, K., *Association between FSH, E1, and E2 levels in urine and serum in premenopausal and postmenopausal women*, Clinical Biochemistry, 2019, 73, 105–108) a także $3,8$ – $8,8$ IU/L u kobiet w okresie premenopauzalnym i $4,5$ – $22,5$ IU/L – w okresie postmenopauzalnym (*Educational Bulletin, Gonadotropin preparations: past, present, and future: Perspectives*, Fertility and Sterility_ Vol. 90, Suppl 3, November 2008, S13-S20, doi:10.1016/j.fertnstert.2008.08.031).

W przypadku chłopców z wadą rozwojową wewnątrzrośnięcia surowica krwi zawiera FSH na poziomie $0,25$ – $2,55$ IU/L (Christiansen, P., Andersson, A-M., Skakkebaek, N.E., Juul, A., *Serum inhibin B, FSH, LH and testosterone levels before and after human chorionic gonadotropin stimulation in prepubertal boys with cryptorchidism*, European Journal of Endocrinology (2002) 147 95–101).

Stężenie FSH w surowicy lub osoczu krwi jest mierzone metodą immunochemiluminiscencyjną (CLIA) (Onizuka, Y., Nagai, K., Ideno, Y., Kitahara, Y., Iwase, A., Yasui, T., Nakajima-Shimada, J., Hayashi, K., *Association between FSH, E1, and E2 levels in urine and serum in premenopausal and postmenopausal women*, Clinical Biochemistry, 2019, 73, 105–108), elektrochemoluminiscencyjną (ECLIA) (Hildorf, S.E., Clasen-Linde, E., Cortes, D., Fossum, M., Thorup, J., *The positive predictive value of using FSH and Inhibin-B serum levels to diagnose gonadotropin insufficiency in bilateral cryptorchid boys is high*, Journal of Pediatric Urology (2022) 18, 844.e1-844.e7.) lub metodą immunofluorymentryczną (Antonio, L., Priskorn, L., Olesen, I.A., Petersen, J.H., Vanderschueren, D., Jorgensen, N., *High serum FSH is not a risk factor for low bone mineral density in infertile men*, Bone, 2020, 136, 115366).

Wszystkie te metody są klasyfikowane jako metody znacznikowe, w których sygnał powstaje od wprowadzonego znacznika a nie bezpośrednio od FSH.

Alternatywną do oznaczania FSH za pomocą tych znacznikowych metod może być zastosowanie techniki matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging (SPRI). Technika ta

odnosi sukcesy w oznaczaniu różnych biomarkerów w płynach ustrojowych, głównie osoczu lub surowicy krwi. Systematycznie jest rozwijana liczba biomarkerów możliwych do oznaczania tą techniką.

Według obecnego stanu techniki istnieją liczne biosensory, wykorzystywane w technice matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, umożliwiające oznaczanie stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe publikacje: JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052, PL222548, PL222549, PL234488, PL 235043, PL235044, PL 235045, PL234329, PL236387, PL236773, PL239340 czy także PL239339.

Technikę matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging cechuje prostota budowy biosensorów w połączeniu ze skutecznością w wykonywaniu praktycznych pomiarów. W odróżnieniu od bardziej rozpowszechnionej przepływowej techniki SPR, oznaczanie techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging nie wymaga skomplikowanego wzmacniania sygnału np. za pomocą wprowadzania do biosensora nanocząsteczek złota. Technika jest z powodzeniem stosowana w licznych badaniach klinicznych o czym świadczą m.in. prace eksperymentalne opublikowane ostatnio w prestiżowych czasopismach jak np.:

- Oldak L., Chludzinska-Kasperuk S., Milewska P., Grubczak K., Reszec J., Gorodkiewicz E. *Laminin-5, fibronectin, and type IV collagen as potential biomarkers of brain glioma malignancy*. Biomedicines 10(2022),2290.
- Oldak L., Milewska P., Chludzinska-Kasperuk S., Grubczak K., Reszec J., Gorodkiewicz E. *Cathepsin B, D and S as potential biomarkers of brain glioma malignancy*. Journal of Clinical Medicine 11(2022)6763.
- Oldak L., Chludzinska-Kasperuk S., Milewska P., Grubczak K., Reszec J., Gorodkiewicz E. *MMP-1, UCH-L1 and 20S proteasome as potential biomarkers supporting the diagnosis of brain glioma*. Biomolecules 12(2022)1477.
- Bogdan, S.; Puścion-Jakubik, A.; Klimiuk, K.; Socha, K.; Kochanowicz, J.; Gorodkiewicz, E. *UCHL1 and Proteasome in Blood Serum in Relation to Dietary Habits, Concentration of Selected Antioxidant Minerals and Total Antioxidant Status among Patients with Alzheimer's Disease*. J. Clin. Med. 2022, 11,412.
- Sankiewicz, A.; Guszcz, T.; Gorodkiewicz, E. *Application of SPRi Biosensors for Determination of 20S Proteasome and UCH-L1 Levels in the Serum and Urine of Transitional Bladder Cancer Patients*. Appl. Sci. 2021, 11, 7835.
- Matuszczak, E.; Cwalina, I.; Tylicka, M.; Wawrzyn, K.; Nowosielska, M.; Sankiewicz, A.; Oldak, Ł.; Gorodkiewicz, E.; Hermanowicz, A. *Levels of Selected Matrix Metalloproteinases—MMP-1, MMP-2 and Fibronectin in the Saliva of Patients Planned for Endodontic Treatment or Surgical Extraction*. J. Clin. Med. 2020, 9, 3971
- Komarowska, M.; Szymańska, B.; Oldak, Ł., Sankiewicz, A., Matuszczak, E., Gorodkiewicz, E., Debek, W., Milewski, R., Hermanowicz, A., *Plasma level of laminin 5 and collagen IV in cryptorchidism*, Advances in Medical Sciences , 65, (2020) 176–181.

Technika matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging została omówiona na tle innych podobnych osiągnięć w pracach przeglądowych: Gorodkiewicz E., Lukaszewski Z., *Recent Progress in Surface Plasmon Resonance Biosensors* (2016–2018), Biosensors, 2018, 4, 132 czy Falkowski P., Łukaszewski Z., Gorodkiewicz E., *Potential of Surface Plasmon Resonance Biosensors in cancer detection*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 194, 113802. Dotychczas nie opracowano biosensora SPRi do oznaczania hormonu folikulotropowego FSH.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania hormonu folikulotropowego FSH w ludzkim materiale biologicznym – w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych (osocze, surowica krwi, ślina) dostosowany do współpracy z techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej – Imaging. Opracowany biosensor wykorzystuje mysie monoklonalne przeciwciała specyficzne na FSH 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 polimerem w postaci siatki, który wyodrębnia miejsca aktywne z warstwą receptorową. Receptor czyli wyżej wymienione przeciwciała jest zimmobilizowane na powierzchni złota wiązaniem kowalencyjnym za pośrednictwem linkera – cysteaminy. Zastosowanie cysteaminy zapewnia korzystne zorientowanie przeciwciała na powierzchni biosensora z częścią Fc zawierającą grupy karboksylowe związaną z linkerem a częścią Fab zawierającą aktywne elementy – skierowaną w kierunku roztworu. Biosensor z częścią Fab mysiego monoklonalnego przeciwciała wychwytuje

wyłącznie oznaczaną substancję z roztworu w postaci niezwiązanej. Aparatura SPRi mierzy sygnał analityczny będący odpowiedzią na przyrost masy na powierzchni biosensora. Rozwiązanie takie cechuje prostota wykonania biosensora oraz przeprowadzenia całego procesu pomiarowego.

Przedmiot wynalazku uwidoczniony jest na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia widok schematyczny biosensora z dziewięcioma partycjami utworzonymi za pomocą siatki polimerowej 1 w układzie 3x3 i przekrój pionowy przez miejsce aktywne, a fig. 2 przedstawia zakres prostoliniowy zależności sygnału SPRi od stężenia FSH.

Biosensor do oznaczania hormonu folikulotropowego FSH techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging składa się z podzielonej na partycje – w przykładzie dziewięć partycji w układzie 3x3 – za pomocą siatki polimerowej 1, płytki szklanej 2, pokrytej warstwą tytanu 3 oraz złota 4.

Warstwa receptorowa składa się z linkera – cysteaminy 5 oraz mysiego monoklonalnego przeciwciała 6 specyficznego na FSH połączonego kowalencyjnie z linkerem – cysteaminą 5. Warstwa receptorowa specyficznie wyłapuje FSH 7 z badanego roztworu.

Biosensor został wykorzystany do oznaczania hormonu folikulotropowego FSH w serii próbek osocza pacjentów. Po 3 μ L osocza z 22 różnych próbek nierozcieńczone nanoszono na poszczególne miejsca aktywne. Mierzono sygnał SPRi. Stężenie hormonu folikulotropowego FSH odczytano z krzywej kalibracyjnej i uzyskano wyniki j/n przedstawione w jednostkach umownych (AU – *arbitrary units*), które przeliczone zostały na wynik w mIU/mL według krzywej kalibracyjnej przedstawionej na fig. 2.

Tablica nr 1 poniżej przedstawia wynik dla 22 próbek nierozcieńczonej surowicy krwi poddanych oznaczaniu.

Tablica 1

Nr próbki	Sygnał analityczny [AU]	Wynik [mIU/mL]
5	1709	10,18
8	1569	9,09
9	1211	6,31
18	1522	8,73
42	1280	6,85
43	1055	5,10
46	1178	6,05
60	1252	6,63
62	1330	7,24
63	1230	6,46
66	1195	6,19
87	1322	7,17
121	1198	6,20
122	1024	4,86
128	1062	5,15
147	1119	5,59
184	1168	5,97
186	1139	7,30
187	984	4,54
208	2671	17,7
212	1116	5,57
215	1600	9,33

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania hormonu folikulotropowego FSH w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który zawiera płytkę szklaną podzieloną na partycje za pomocą siatki polimerowej i pokrytą warstwą złota na podłożu tytanu oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową, **znamienny tym**, że warstwę receptorową stanowi mysie monoklonalne przeciwciało specyficzne na FSH (6) połączone kowalencyjnie z linkerem, w postaci cysteaminy (5), łączącym receptor z warstwą tytanu (3) oraz złota (4) pokrywającą płytkę szklaną (2).

Rysunki

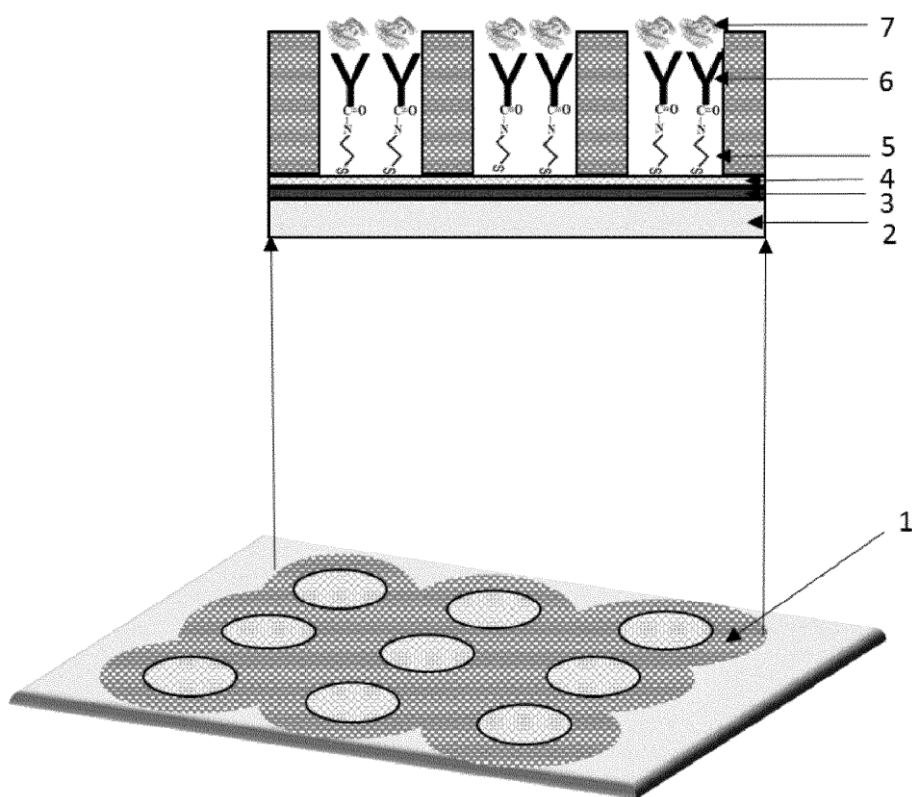


fig. 1

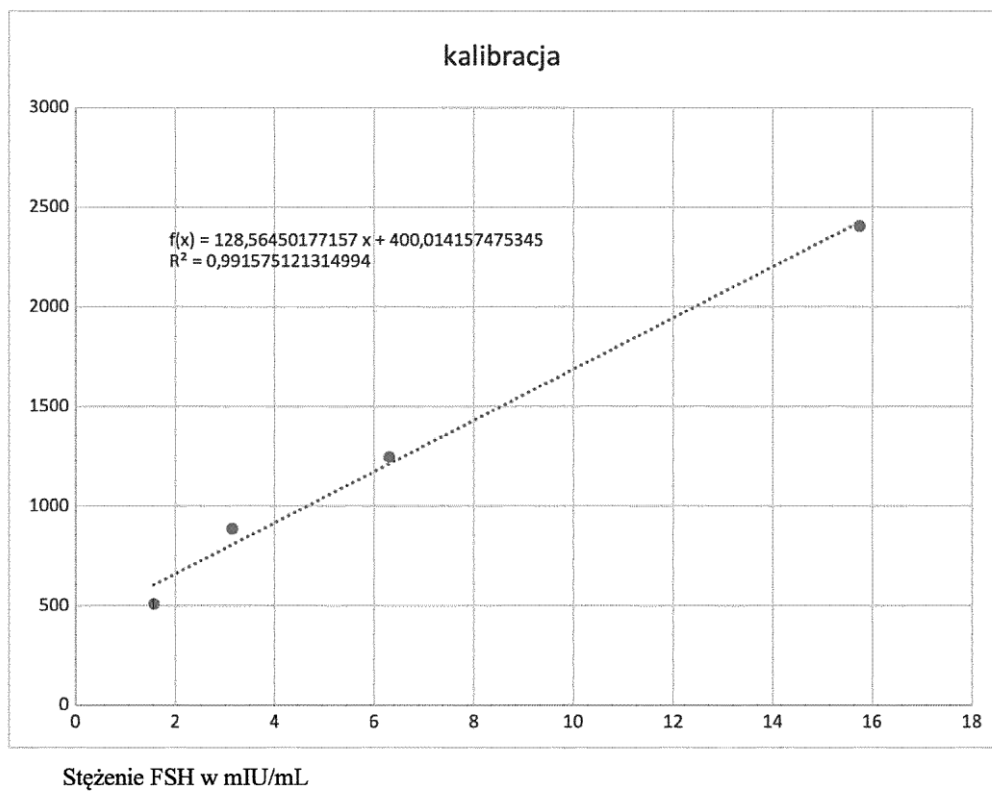


fig. 2