

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 448953 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **448953**

(22) Data zgłoszenia: **2024.06.24**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2025.12.29 BUP 52/2025**

(51) MKP:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 21/41 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

G01N 21/00 (2006.01)

(71) Zgłaszający:

**UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL**

(72) Twórca(-y):

ZUZANNA ZIELIŃSKA, Białystok, PL

ŁUKASZ OŁDAK, Białystok, PL

EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL

(74) Pełnomocnik:

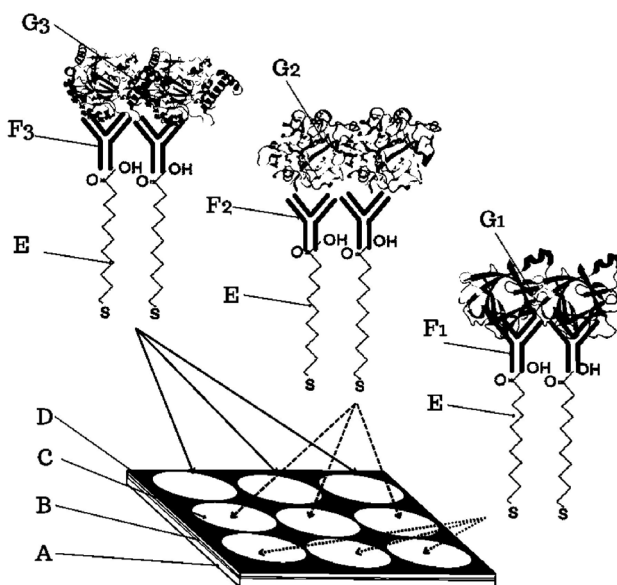
rzecz. pat. Iwona Płodzich-Hennig, Gdańsk, PL

(54) Tytuł:

**Panel diagnostyczny do oznaczania czynników proangiogennych techniką SPRI,
przeznaczony do wczesnej diagnostyki chorób nowotworowych**

(57) Skróót opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest panel diagnostyczny do równoczesnego oznaczania czynników proangiogennych w płynach ustrojowych techniką obrazowania powierzchniowego rezonansu plazmonów w czasie jednego pomiaru, składający się ze szklanej płytki (A) z napyłoną na nią kolejno warstwą tytanu (B), na którą napyłona jest warstwa złota (C), na którą to warstwę nałożona jest nieciągła warstwa folii polimerowej (D), mająca przynajmniej trzy otwory wyznaczające miejsca pomiarowe (E), na które nałożona jest warstwa linkera w postaci kwasu merkaptoundekanowego 11-MUA, do których przyłączone są mysie monoklonalne przeciwciała, specyficzne w każdym z miejsc pomiarowych (E) do innego czynnika proangiogennego, odpowiednio względem HIF-1 α , angiopoetyny-2 (ANG-2) oraz interleukiny-1 β (IL-1 β), tworząc przynajmniej trzy różne biosensory w jednym panelu diagnostycznym. Opcjonalnie panel diagnostyczny może zawierać dodatkowo kontrolne miejsce pomiarowe, utworzone przez dodatkowy otwór w folii polimerowej (D), na które nałożona jest warstwa linkera oraz warstwa roztworu buforowego PBS z dodatkiem albuminy surowicy bydlęcej (BSA) lub albuminy surowicy ludzkiej (HSA).



Panel diagnostyczny do oznaczania czynników proangiogennych techniką SPRI, przeznaczony do wczesnej diagnostyki chorób nowotworowych.

- [001]** Przedmiotem wynalazku jest panel diagnostyczny służący do ilościowych oznaczeń czynników proangiogennych techniką obrazowania powierzchniowego rezonansu plazmonów (ang. Surface Plasmon Resonance imaging, dalej jako SPRI), przeznaczony do wczesnej diagnostyki chorób nowotworowych.
- [002]** Angiogeneza jest procesem powstawania nowych naczyń krwionośnych z naczyń już istniejących. W normalnym, fizjologicznym stanie organizmu związana jest z gojeniem się ran, embriogenezą, oraz owulacją. W patologicznych procesach związana jest z retinopatią cukrzycową, niedokrwieniem serca, reumatoidalnym zapaleniem stawów i co najważniejsze – **ze wzrostem guza nowotworowego i przerzutowaniem** [1,2]. Hipoksja, określana jako niedotlenienie komórkowe, jest stanem zawsze obecnym w środowisku nowotworu, z powodu szybkiego wzrostu chorobowo zmienionych komórek, którym nie towarzyszy fizjologiczne, odpowiednie ukrwienie, a więc w konsekwencji dostępność tlenu i składników odżywczych jest ograniczona. W odpowiedzi na stan hipoksji w środowisku guza, czynniki stymulujące angiogenezę wytwarzane przez komórki nowotworowe, indukują powstawanie nowego dopływu krwi do guza, czyli wytworzenie nowego naczynia krwionośnego, co wpływa na jego dalszy wzrost i rozwój. Jednym z takich czynników angiogennych jest **HIF-1 α** , który pozwala na utrzymanie odpowiednich warunków rozwoju guza poprzez adaptację metaboliczną do niskiego poziomu tlenu, tworzenie naczyń krwionośnych, co sprzyja przeżywalności komórek nowotworowych [3]. Kolejny związek – angiopoetyna-2, (dalej jako ANG-2), pozwala na modulowanie tworzenia naczyń krwionośnych guza we współpracy z VEGF-A, czyli czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego – kluczowego związku w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych [4]. ANG-2 jest niezbędnym czynnikiem dla fizjologii komórek śródbłonna – reguluje jego przepuszczalność i funkcje angiogenne. Ekspresja ANG-2 jest wyzwalana przez mediatory stanu zapalnego oraz stany niedotlenienia przy obecności nowotworu. Badania wskazują, że poziomy ekspresji ANG-2 są proporcjonalne do stadium raka – jej hamowanie lub

nadekspresja zmniejszała się lub zwiększała, odpowiednio do wielkości guza i skuteczności przerzutowania [5].

- [003]** Regulatorem działania HIF-1 α jest również interleukina-1 β (dalej jako IL-1 β), która nie tylko indukuje jego ekspresję, ale też powoduje ekspresję docelowego genu HIF-1 w warunkach normoksji lub niedotlenienia. Poza tym zwiększa przepuszczalność komórek, jeśli chodzi o aktywację HIF-1 α i VEGF-A, a więc wpływa na rozwój nowych naczyń. Badania wskazują, iż IL-1 β i inne cytokiny prozapalne, które aktywują komórki śródbłonna do wytwarzania VEGF-A, zapewniają mikrośrodowisko zapalne do angiogenezy i progresji nowotworu [6]. Wszystkie procesy dotyczące opisanych białek – aktywacja **HIF-1 α** , połączenie z regulatorami takimi jak **ANG-2** czy **IL-1 β** mają wpływ na progresję nowotworu, a także rokowanie. Żaden z tych związków nie jest biomarkerem zatwierdzonym w rutynowej diagnostyce nowotworów.
- [004]** W literaturze znaleźć można biosensory do oznaczania wskazanych białek, jednak wykorzystują one inne technologie [7, 8, 9] i nie umożliwiają jednoczesnych oznaczeń wszystkich trzech czynników jednocześnie. Pierwszy z nich to elektrochemiczny test immunologiczny oparty na kulkach magnetycznych (MB) do oznaczania HIF-1 α . Jest to kanapkowy test immunologiczny z detekcją amperometryczną na jednorazowych elektrodach węglowych z nadrukiem sitowym (SPCE) [7]. W kolejnej pracy oznaczono ANG-2 z użyciem biochipów opartych na kryształach fonicznych 1-D obsługujących fale powierzchniowe Blocha. Jest to biosensor optyczny bez użycia znaczników [8]. Badania nad IL-1 β prowadzono z użyciem elektrochemicznego czujnika polimerowego z nadrukiem molekularnym (MIP), opartego na zmodyfikowanej komercyjnej elektrodzie węglowej z nadrukiem sitowym (SPCE). Do oznaczeń wykorzystano elektrochemiczną spektroskopię impedancyjną (EIS).
- [005]** Problemem technicznym stawianym przed niniejszym wynalazkiem jest zapewnienie rozwiązania, które umożliwia równoczesne oznaczanie w czasie jednego pomiaru kilku czynników proangiogennych w ludzkich płynach ustrojowych, z wysoką specyficznością oraz czułością, przeznaczonego do wczesnej diagnostyki chorób nowotworowych.
- [006]** Istotą wynalazku jest panel diagnostyczny do równoczesnego oznaczania w czasie jednego pomiaru czynników proangiogennych w płynach ustrojowych techniką obrazowania powierzchniowego rezonansu plazmonów SPRI, składający się ze

szklanej płytki (A) z napyłoną na nią kolejno warstwą tytanu (B), na którą napyłona jest warstwa złota (C), na którą to warstwę złota (C) nałożona jest nieciągła warstwa folii polimerowej (D), charakteryzujący się tym, że warstwa folii polimerowej (D) ma przynajmniej trzy otwory wyznaczające miejsca pomiarowe (E_{1-3}) panelu diagnostycznego, na które nałożona jest warstwa linkera w postaci kwasu merkaptoundekanowego 11- MUA, do których następnie przyłączone są mysie monoklonalne przeciwciała (F_{1-3}), specyficzne w każdym z miejsc pomiarowych do innego czynnika proangiogenne, odpowiednio względem interleukiny-1 β (IL-1 β , F_1) oraz HIF-1 α angiopoetyny-2 (ANG-2, F_2) i HIF-1 α (F_3), tworząc przynajmniej trzy różne biosensory w jednym panelu diagnostycznym, które selektywnie wychwytyją z roztworów próbek odpowiednie anality obejmujące IL-1 β i ANG-2 oraz HIF-1 α , przy czym opcjonalnie warstwa folii polimerowej ma przynajmniej jeden dodatkowy otwór, który stanowi kontrolne miejsce pomiarowe, gdzie na warstwę linkera nakłada się roztwór buforowy PBS z dodatkiem 1 mg/ml albuminy surowicy bydlęcej (BSA) lub albuminy surowicy ludzkiej (HSA).

- [007]** Stosowane w opisie wynalazku wyrażenie panel diagnostyczny oznacza szklaną płytkę (A) z przynajmniej trzema miejscami pomiarowymi (E_{1-3}). W przypadku, gdy miejsce pomiarowe (E) jest pokryte mysimi monoklonalnymi przeciwciałami względem interleukiny-1 β (IL-1 β) lub angiopoetyny-2 (ANG-2) lub HIF-1 α jest to aktywne miejsce pomiarowe stanowiące biosensor, natomiast w przypadku, gdy miejsce pomiarowe (E) pokryte jest roztworem buforowym z dodatkiem albuminy surowicy bydlęcej lub ludzkiej, takie miejsce pomiarowe stanowi kontrolę.
- [008]** Rozwiązanie według wynalazku jako technikę detekcji wykorzystuje obrazowanie SPRI, którego działanie i zastosowanie przedstawiono w pracach [10, 11, 12]. Nie opracowano w stanie techniki do tej pory panelu diagnostycznego opartego o biosensory SPRI, który umożliwiałby jednoczesne oznaczanie różnych białek w czasie jednego pomiaru. Dlatego rozwiązanie według wynalazku dostarcza rozwiązanie problemu z oznaczaniem kilku czynników proangiogennych w ludzkich płynach ustrojowych w czasie jednego pomiaru, z jednej próbki, z wysoką specyficznością oraz czułością, które jest szczególnie ważne we wczesnym wykrywaniu zmian nowotworowych.
- [009]** W rozwiązaniu według wynalazku płytka szklana (A) korzystnie wykonana jest ze szkła typu BK7 i może przyjmować różne kształty, w zależności od potrzeb.

- [0010]** W jednym z wariantów wynalazku panel diagnostyczny ma kształt kwadratowy z symetrycznie ułożonymi na nim miejscami pomiarowymi w układzie 3X3, tak, że panel ma dziewięć miejsc pomiarowych (E_{1-9}) ułożonych po trzy w każdym rzędzie, do których przyłączone są mysie monoklonalne przeciwciała, specyficzne w każdym rzędzie miejsc pomiarowych (E_{1-9}) do innego czynnika proangiogenego, odpowiednio względem HIF-1 α , angiopoetyny-2 (ANG-2) oraz interleukiny-1 β (IL-1 β), formując w ten sposób dziewięć biosensorów w jednym panelu diagnostycznym.
- [0011]** W rozwiązaniu według wynalazku możliwe jest również inne rozmieszczenie miejsc pomiarowych i różny rozkład przeciwciał względem danego czynnika proangiogenego. W innym wariantcie rozwiązania według wynalazku panel diagnostyczny może posiadać oprócz biosensorów również jedno lub kilka kontrolnych miejsc pomiarowych, wówczas pomiarowe miejsce kontrolne składa się z warstwy tytanu (B), złota (C), na którą nałożona jest warstwa folii polimerowej (D) z otworami, na które naniesiono warstwy kolejno kwasu merkaptoundekanowego 11- MUA jako linkera i roztworu buforowego PBS z dodatkiem 1 mg/ml albuminy surowicy bydlęcej (BSA) lub albuminy surowicy ludzkiej (HSA).
- [0012]** Panel diagnostyczny według wynalazku przeznaczony jest do zastosowania we wczesnej diagnostyce chorób nowotworowych, gdzie oznacza się w czasie jednego pomiaru w jednej próbce ludzkiego płynu ustrojowego, na przykład surowicy krwi obecność i stężenie czynników proangiogennych i na tej podstawie przeprowadza się analizę obecności i stanu zaawansowania zmian nowotworowych.
- [0013]** Panel diagnostyczny według wynalazku bliżej objaśniono w przykładzie wykonania, na rysunku, na którym:
- fig. 1. przedstawia jego budowę, gdzie panel składa się podłoża w postaci płytki (A) wykonanej korzystnie ze szkła BK7, na którą napylone są kolejno warstwa tytanu (B) i warstwa złota (C) oraz płytka (A) pokryta jest nieciągłą warstwą folii polimerowej (D), przy czym folia polimerowa (D) ma dziewięć otworów, które wyznaczają miejsca pomiarowe (E_{1-9}). Na miejsca pomiarowe (E_{1-9}) naniesiona jest warstwa kwasu merkaptoundekanowego 11- MUA stanowiącego linker dla monoklonalnych mysich przeciwciał (F_{1-3}), którymi pokrywane są miejsca pomiarowe (E_{1-9}), formując w ten sposób biosensory do ilościowego oznaczania stężenia czynników proangiogennych. Do każdego trzech miejsc pomiarowych (E_{1-9}), przyłączone są przeciwciała

specyficzne względem innego czynnika proangiogennego, obejmującego IL-1 β (F_1), ANG-2 (F_2) i HIF-1 α (F_3), tworząc panel diagnostyczny mający po trzy biosensory stanowiące receptory, które selektywnie wychwytyją z roztworów próbek odpowiednie anality: IL-1 β (G_1), ANG-2 (G_2) i HIF-1 α (G_3); (biosensory).

fig. 2-4 przedstawiają krzywe kalibracyjne wykreślone dla czynników proangiogennych oznaczanych za pomocą panelu diagnostycznego.

PRZYKŁAD

Oznaczanie czynników proangiogennych interleukiny-1 β (IL-1 β), angiopoetyny-2 (ANG-2) oraz HIF-1 α w osoczu.

- [0014] Przygotowano panel diagnostyczny z dziewięcioma miejscami pomiarowymi (E_{1-9}), jak opisano na fig.1
- [0015] Przed rozpoczęciem właściwych pomiarów przygotowano krzywe kalibracyjne wykreślone dla każdego z czynników proangiogennych IL-1 β (G_1), ANG-2 (G_2) i HIF-1 α (G_3). Wzorce w stężeniach przedstawionych na fig.2-4 nakładano na miejsca pomiarowe, gdzie badany analit wiązał się z monoklonalnym przeciwciałem specyficznym wobec danego czynnika proangiogennego i w aparacie do powierzchniowego rezonansu plazmonów dokonywano pomiaru sygnału SPRI przy długości światła 635 nm i emitowanego przez diodę laserową o mocy 0.5 W w zakresie kątów 30 – 40°. Liniowa odpowiedź biosensorów umożliwiła dokładne wyznaczenie wartości stężeń IL-1 β (G_1), ANG-2 (G_2) i HIF-1 α (G_3) w później badanych próbkach.
- [0016] Następnie, sprawdzono wartości granicy wykrywalności (LOD) i granicy oznaczalności (LOQ), które pozwalają na oznaczenie IL-1 β (G_1), ANG-2 (G_2) i HIF-1 α (G_3) na niskich poziomach stężeń, występujących w osoczu człowieka. Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Wartości granicy wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) dla badanych białek.

	IL-1 β	ANG-2	HIF-1 α
LOD [pg · ml ⁻¹]	0,01	0,01	0,09
LOQ [pg · ml ⁻¹]	0,02	0,039	0,27

[0017] Precyzję i dokładność oznaczeń, które wykonano z użyciem panelu diagnostycznego według wynalazku określono poprzez 3-krotny pomiar stężeń roztworów standardowych o stężeniach rzeczywistych:

- IL-1 β – 1; 5; 10; 15 pg · ml⁻¹
- ANG-2 – 1; 5; 10; 20 pg · ml⁻¹
- HIF-1 α – 5; 10; 50; 100 pg · ml⁻¹

[0018] Obliczono odchylenia standardowe (SD), średnią arytmetyczną stężeń z 3 powtórzeń pomiaru ($C_{\text{średnie}}$), a następnie współczynnik zmienności (CV). Niskie wartości odchylenia standardowego mówią o wysokiej precyzji. Współczynnik CV niższy od 20% wskazuje na wysoką precyzję oznaczeń. Wyniki dla trzech związków przedstawiono w Tabeli 2. Współczynnik zmienności (CV) obliczono ze wzoru:

$$CV = \frac{SD}{C_{\text{średnie}}} \cdot 100\%$$

SD – odchylenie standardowe

$C_{\text{średnie}}$ – średnia arytmetyczna stężenia z 3 powtórzeń pomiaru

Tabela 2. Wyniki parametrów precyzji i dokładności oznaczeń białek z wykorzystaniem panelu diagnostycznego według wynalazku

Stężenie roztworu standardowego HIF-1α [pg · ml⁻¹]	5	10	50	100
SD [pg · ml ⁻¹]	0,72	1,01	1,83	6,43
$C_{\text{średnie}}$ [pg · ml ⁻¹]	5,14	12,20	44,85	75,04
CV [%]	14,09	8,28	4,08	8,57

Stężenie roz- tworu standar- dowego ANG-2 [pg · ml⁻¹]	1	5	10	20
SD [pg · ml ⁻¹]	0,13	0,18	1,18	1,14
C _{średnie} [pg · ml ⁻¹]	1,93	6,26	12,41	20,08
CV [%]	6,83	2,85	9,51	5,70
Stężenie roz- tworu standar- dowego IL-1β [pg · ml⁻¹]	1	5	10	15
SD [pg · ml ⁻¹]	0,20	0,46	0,91	0,54
C _{średnie} [pg · ml ⁻¹]	1,19	4,73	10,16	15,005
CV [%]	16,94	9,66	8,92	3,62

[0019] Powtarzalność wyników uzyskiwanych za pomocą panelu diagnostycznego według wynalazku zbadano poprzez 3-krotną analizę ilościową próbki rzeczywistej. Powtarzalność została określona za pomocą uśrednionej wartości współczynnika zmienności CV. Wartości CV wynosiły odpowiednio: 7,18 % dla HIF-1α; 5,06 % dla angiopoetyny-2 i 2,57 % dla interleukiny-1β. Wartości CV wskazują na to, że wykonane oznaczenie w próbce materiału biologicznego jest powtarzalne.

[0020] Biosensor jest specyficzny względem wykrywanego związku, a więc selektywnie wychwytuje badany analit z próbki w obecności innych składników znajdujących się w płynach biologicznych. Parametrem badania specyficzności jest wyznaczona wartość odzysku.

$$\text{Odzysk} = \frac{C_1}{C_0} \cdot 100\%$$

C_0 – znana ilość analitu w badanej próbce

C_1 – oznaczona ilość analitu w badanej próbce

[0021] Każde z białek mieszano z roztworami wybranych interferentów w stosunku stężeniowym 1 : 10 i 1 : 100. Wybrane interferenty dla białek to:

- dla HIF-1 α : ANG-2, IL-1 β , VEGF-A
- dla ANG-2: HIF-1 α , IL-1 β , VEGF-A
- dla IL-1 β : HIF-1 α , ANG-2, VEGF-A.

[0022] Uzyskane średnie wartości odzysków wynoszą:

- HIF-1 α – 103,33%
- ANG-2 – 106,97%
- IL-1 β – 100,44%

[0023] Aby udowodnić potencjał aplikacyjny panelu diagnostycznego według wynalazku, wykonano jednoczesne oznaczenia HIF-1 α , ANG-2 i IL-1 β w próbkach osocza pacjentów ze stwierdzonym glejakiem mózgu. Przed przystąpieniem do oznaczeń próbki rozcieńczano buforem PBS tak, aby sygnał odpowiedzi detektora mieścił się w zakresie liniowym wykreślonych krzywych kalibracyjnych:

- dla oznaczenia HIF-1 α – próbki rozcieńczano 1000-krotnie;
- dla oznaczenia ANG-2 – próbki rozcieńczano 2-krotnie;
- dla oznaczenia IL-1 β – próbki rozcieńczano 10-krotnie.

[0024] W każde z miejsc aktywnych panelu diagnostycznego podano po 3 μ L każdej próbki. Po 10 minutach miejsca aktywne przemywano dwukrotnie z użyciem buforu PBS. Następnie mierzono sygnał SPRi. Wychwycone z próbek 1-9 białka HIF-1 α , ANG-2 i IL-1 β dają sygnał SPRi wprost proporcjonalny do unieruchomionych w biosensorach mas wychwyconych białek, co pozwala na odczytanie ich stężeń z wykorzystaniem krzywych kalibracyjnych. W Tabeli 3 przedstawiono otrzymane wyniki.

Tabela 3. Zestawienie wyników oznaczonych białek w osoczu.

	Stężenie HIF-1 α [ng · ml ⁻¹]	Stężenie ANG-2 [pg · ml ⁻¹]	Stężenie IL-1 β [pg · ml ⁻¹]
Próbka 1	45,61	40,75	128,47
Próbka 2	54,65	40,86	117,77
Próbka 3	93,28	23,39	110,35
Próbka 4	79,67	24,79	144,81

Próbka 5	85,01	22,01	157,52
Próbka 6	78,81	33,72	83,15
Próbka 7	96,60	5,35	54,16
Próbka 8	90,80	23,39	145,77
Próbka 9	84,34	23,22	110,28

Wykaz oznaczeń:

- A-** płytką szklaną
- B-** warstwa tytanu
- C-** warstwa złota
- D-** folia polimerowa
- E-** miejsce pomiarowe biosensora
- F₁, G₁-** IL-1 β
- F₂, G₂-** ANG-2
- F₃, G₃-** HIF-1 α

Bibliografia:

- [1] Houck, K. A.; Ferrara, N.; Winer, J.; Cachianes, G.; Li, B.; Leung, D. W. The Vascular Endothelial Growth Factor Family: Identification of a Fourth Molecular Species and Characterization of Alternative Splicing of RNA. *J Mol Endocrinol* 1991, 5(12), 1806–1814. <https://doi.org/10.1210/mend-5-12-1806>
- [2] Shi, Y.-H.; Fang, W.-G. Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004, 10(8), 1082. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i8.1082>
- [3] Carmeliet, P.; Dor, Y.; Herbert, J.M. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 1998, 394, 485–490, <https://doi.org/10.1038/28867>
- [4] Hu, B.; Cheng, S.Y. Angiopoietin-2: Development of inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 2009, 11, 111–116. <https://doi.org/10.1007/s11912-009-0017-3>
- [5] Akwii, R.G.; Sajib, M.S.; Zahra, F.T.; Mikelis, C.M. Role of Angiopoietin-2 in Vascular Physiology and Pathophysiology. *Cells* 2019, 8, 471. <https://doi.org/10.3390/cells8050471>
- [6] Carmi, Y.; Dotan, S.; Rider, P.; Kaplanov, I.; White, M.R.; Baron, R.; Abutbul, S.; Huszar, M.; Dinarello, C.A.; Apte, R.N.; Voronov, E. The Role of IL-1 β in the Early Tumor Cell-Induced Angiogenic Response. *J Immunol* 2013, 190 (7), 3500–3509. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202769>
- [7] Muñoz-San Martín, C.; Gamella, M.; Pedrero, M.; Montero-Calle, A.; Barderas, R.; Campuzano, S.; Pingarrón, J.M. Magnetic beads-based electrochemical immunosensing of HIF-1 α , a biomarker of tumoral hypoxia. *Sensors Actuators B* 2020, 307, 127623. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127623>
- [8] Sinibaldi, A.; Danz, N.; Anopchenko, A.; Munzert, P.; Schmieder, S.; Chandrawati, R.; Rizzo, R.; Rana, S.; Sonntag, F.; Occhicone, A.; Napione, L.; De Panfilis, S.; Stevens, M.M.; Michelotti, F. Label-Free Detection of Tumor Angiogenesis Biomarker Angiopoietin 2 Using Bloch Surface Waves on One Dimensional Photonic Crystals. *J Lightwave Technol* 2015, 33, 3385–3393. <https://doi.org/10.1109/JLT.2015.2448795>
- [9] Cardoso, A.R.; de Sá, M.H.; Goreti, M.; Sales, F. An impedimetric molecularly-imprinted biosensor for Interleukin-1 β determination, prepared by in-situ electropolymerization on carbon screen-printed electrodes. *Bioelectrochem* 2019, 130, 1567–1594. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.04.017>
- [10] Gorodkiewicz, E.; Lukaszewski, Z. Recent Progress in Surface Plasmon Resonance Biosensors. *Biosensors (Basel)* 2018, 16, 8(4), 132. <https://doi.org/10.3390/bios8040132>
- [11] Wang, D.; Loo, J.F.C.; Chen, J.; Yam, Y.; Chen, S.-C.; He, H.; Kong, S.K.; Ho, H.P. Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors. *Sensors* 2019, 19, 1266. <https://doi.org/10.3390/s19061266>
- [12] Capelli, D.; Scognamiglio, V.; Montanari, R.; Surface plasmon resonance technology: Recent advances, applications and experimental cases. *TrAC* 2023, 163, 117079. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117079>

Zastrzeżenia patentowe

1. Panel diagnostyczny do równoczesnego oznaczania stężenia czynników proangiogennych w płynach ustrojowych techniką obrazowania powierzchniowego rezonansu plazmonów składający się ze szklanej płytki (A) z napyloną na nią kolejno warstwą tytanu o grubości 1 nm (B), na którą napylona jest warstwa złota o grubości 50 nm (C), na którą to warstwę nałożona jest nieciągła warstwa folii polimerowej (D), **znamienny tym, że** warstwa folii polimerowej (D) ma przynajmniej trzy otwory wyznaczające aktywne miejsca pomiarowe (E_{1-3}), na które nałożona jest warstwa kwasu merkaptoundekanowego 11- MUA stanowiącego linker dla monoklonalnych przeciwciał (F_{1-3}), którymi pokrywane są miejsca pomiarowe (E_{1-3}), przy czym do każdego z miejsc pomiarowych (E_{1-3}), przyłączone są przeciwciała specyficzne względem innego czynnika proangiogennego, obejmującego IL-1 β (F_1) i ANG-2 (F_2) oraz HIF-1 α (F_3), tworząc przynajmniej trzy różne biosensory w jednym panelu diagnostycznym, które selektywnie wychwytyją z roztworów próbek odpowiednie anality obejmujące IL-1 β (G_1), ANG-2 (G_2) oraz HIF-1 α (G_3), przy czym opcjonalnie panel diagnostyczny może zawierać dodatkowo przynajmniej jedno kontrolne miejsce pomiarowe, utworzone przez dodatkowy otwór w folii polimerowej (D), na które nałożona jest warstwa linkera oraz warstwa roztworu buforowego PBS z dodatkiem albuminy surowicy bydlęcej (BSA) lub albuminy surowicy ludzkiej (HSA).
2. Panel według zastrzeżenia 1, **znamienny tym, że** płytka szklana (A) wykonana jest ze szkła typu BK7.
3. Panel według zastrzeżenia 1 lub 2, **znamienny tym, że** do każdego z miejsc pomiarowych (E_{1-3}), przyłączone są mysie przeciwciała monoklonalne specyficzne względem innego czynnika proangiogennego, obejmującego IL-1 β (F_1), ANG-2 (F_2) i HIF-1 α (F_3).

4. Panel według któregokolwiek z zastrzeżeń 1-3, **znamienny tym, że** warstwa folii polimerowej (D) ma 9 miejsc pomiarowych (E_{1-9}) ułożonych po trzy w każdym rzędzie, do których przyłączone są mysie monoklonalne przeciwciała, specyficzne w każdym rzędzie miejsc pomiarowych (E_{1-9}) do innego czynnika proangiogennego, odpowiednio względem HIF-1 α , angiopoetyny-2 (ANG-2) oraz interleukiny-1 β (IL-1 β).
5. Panel według któregokolwiek z zastrzeżeń 1-4, **znamienny tym, że** warstwa roztworu buforowego PBS zawiera albuminę surowicy bydlęcej (BSA) lub albuminę surowicy ludzkiej (HSA) w stężeniu 1 mg/ml.
6. Panel biosensora według któregokolwiek z zastrzeżeń 1-5 do zastosowania we wczesnej diagnostyce chorób nowotworowych.
7. Panel biosensora według zastrzeżenia 6 do zastosowania we wczesnej diagnostyce guzów litych, w szczególności glejaka mózgu.

Rysunki

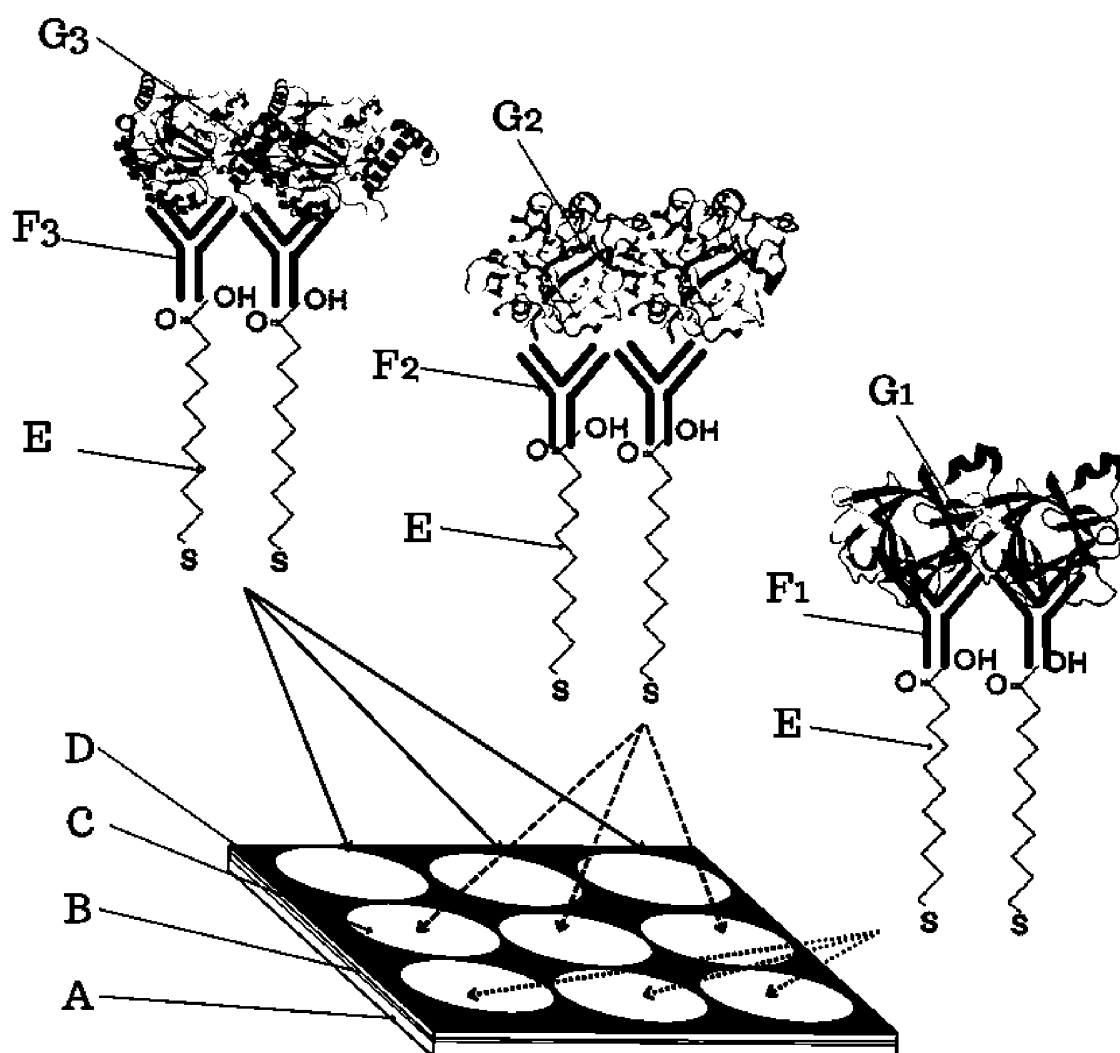


Fig. 1

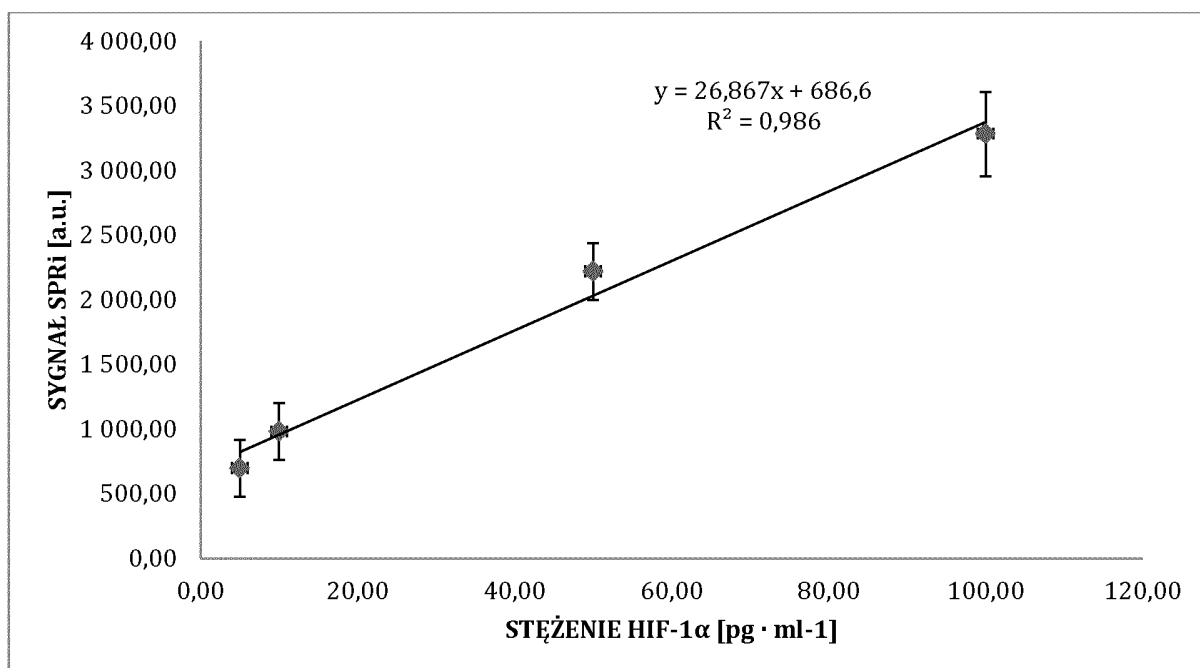


Fig. 2

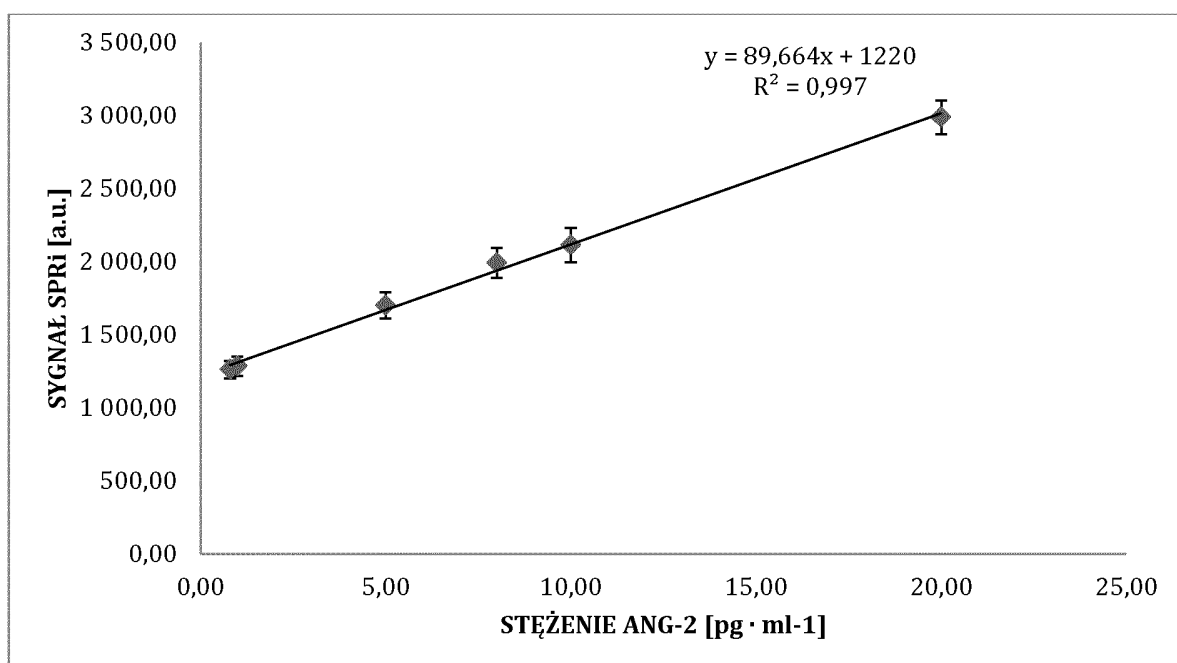


Fig.3

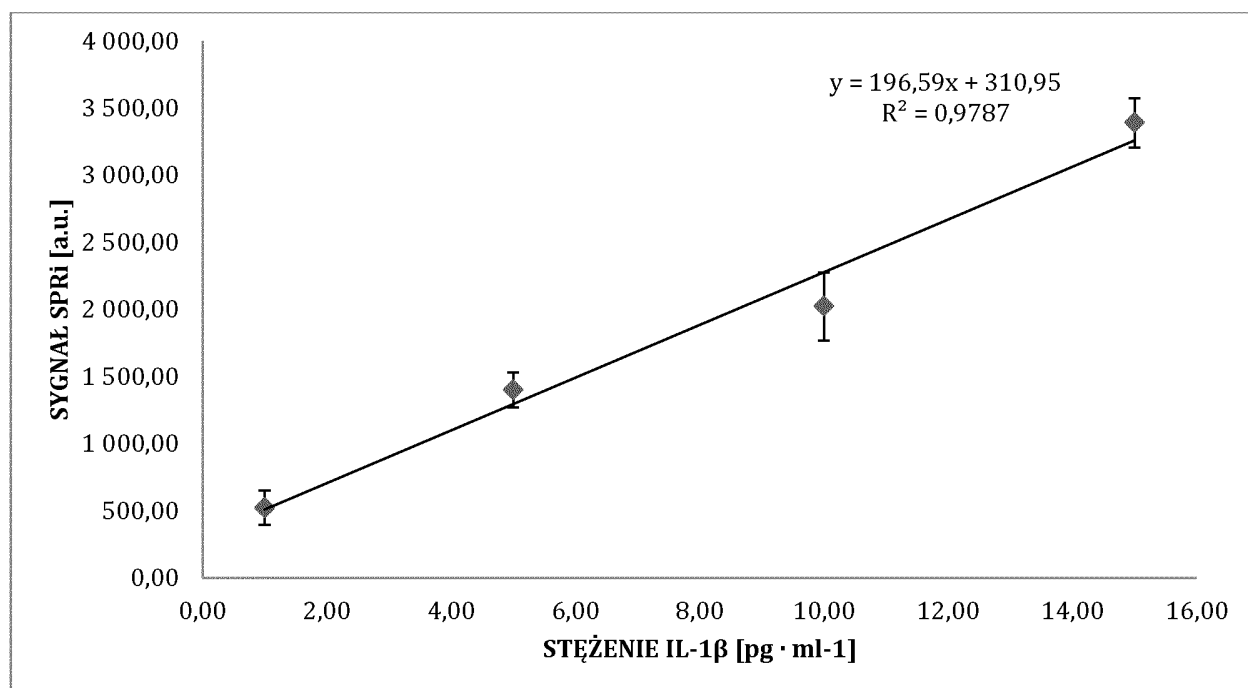


Fig.4

SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR **P.448953**

Klasyfikacja zgłoszenia: G01N 33/543, G01N 33/574, G01N 33/553, G01N 21/41, G01N 21/55, G01N 21/00

Podklasy w których prowadzono poszukiwania: G01N

Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: Bazy EPO AbS, bazy UPRP, Internet

Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	Szymanska B et al., A Multiple-Array SPRi Biosensor as a Tool for Detection of Gynecological-Oncological Diseases, Biosensors (Basel). 2023 Feb 16;13(2):279. doi: 10.3390/bios13020279, /cały dokument/	1-7
A	PL438864 A1 (Politechnika Poznańska i in.) 06-03-2023 /cały dokument/	1-7
A	Ma J. et al., A Novel Micro SPR Sensor with Multiple Sensing Areas for Joint Detection of Early Liver Cancer Markers, 2021 21st International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers), Orlando, FL, USA, 2021, pp. 759-762, doi: 10.1109/Transducers50396.2021.9495738 /abstrakt/	1-7
A	Das S et al., Surface Plasmon Resonance (SPR) Sensor for Cancer Biomarker Detection, Biosensors (Basel). 2023 Mar 17;13(3):396. doi: 10.3390/bios13030396, /cały dokument/	1-7

☐ Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie

A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie,
 E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia,
 L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu,
 O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób,
 P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa,
 T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku,
 X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie,
 Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy,
 & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.

Sprawozdanie wykonał/-a:

Luiza Godecka
Ekspert

Data:

09.04.2025

Podpis:

/podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. z dnia 24-06-2024 r.