

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 248715 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **447285**

(22) Data zgłoszenia: **2023.12.27**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2025.06.30 BUP 26/2025**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2026.01.19 WUP 03/2026**

(51) MKP:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (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 mezoteliny techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging

PL 248715 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor, wykorzystujący jako metodę detekcji powierzchniowy rezonans plazmonowy w wersji Imaging do ilościowych i selektywnych oznaczeń mezoteliny w ludzkim materiale biologicznym.

Mezotelina (MSLN) jest glikoproteiną błonową zakotwiczoną w glikozylofosfatydilinozytolu (GPI), która jest fizjologicznie ekspresjonowana na powierzchni komórek mezotelialnych wyściełających opłucną, osierdzie i otrzewną. Chociaż mezotelina jest przyłączona do błony komórkowej, może być uwalniana jako forma rozpuszczalna podobnie jak wiele innych białek błony komórkowej [Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, Onda M. *Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer*. Clin Cancer Res. (2006); 12(2): 447–53.].

MSLN ulega nadekspresji w tkankach raka jajnika ze słabymi rokowaniami, a rozpuszczalna forma jest wykrywalna we krwi. Podwyższone poziomy mezoteliny w surowicy są wykrywalne u 40–67% pacjentów z rakiem jajnika [Shen J, Sun X, Zhou J. *Insights Into the Role of Mesothelin as a Diagnostic and Therapeutic Target in Ovarian Carcinoma*. Front Oncol. 2020; 10:1263].

Ulega również ekspresji w raku żołądka, płuc, trzustki oraz w międzybłoniaku [Hatterer E, Chauchet X, Richard F, Barba L, Moine V, Chatel L, et al. *Targeting a membrane-proximal epitope on mesothelin increases the tumoricidal activity of a bispecific antibody blocking CD47 on mesothelin-positive tumors*. MAbs (2020) 12(1): 1739408.].

Wykryto ekspresję dojrzałego, związanego z powierzchnią białka-mezoteliny w tkance glejaka wielopostaciowego oraz oznaczono w podwyższonych ilościach w krążeniu ogólnoustrojowym. [Z. Liu, M. Rao, T. Poiret, S. Nava, Q. Meng, Avon Landenberg, J. Bartek Jr., S. Xie, G. Sinclair, I. Peredo, E. Doodoo, M. Maeurer, *Mesothelin as a novel biomarker and immunotherapeutic target in human glioblastoma*, Oncotarget, 8 (2017), pp. 80208–80222].

MSLN może odgrywać rolę w adhezji komórek, progresji nowotworu, przerzutach i chemooporności. Wykazano również, że mezotelina wiąże się z antygenem znanym jako CA125, antygen nowotworowy 125 przez co może upośledzać procesy adhezji komórkowej, co z kolei może być przyczyną wewnątrzotrzewnowego rozsiewu raka jajnika i tworzenia się wodobrzusza [Sasaki A, Akita K, Ito F, Mori T, Kitawaki J, Nakada EL, *Difference in mesothelin-binding ability of serum CA125 between patients with endometriosis and epithelial ovarian cancer*. Int J Cancer. (2015); 136(8): 1985–90.].

Przewagą mezoteliny w porównaniu z innymi biomarkerami raka jajnika może być fakt zidentyfikowania jej frakcji rozpuszczalnej nie tylko w surowicy krwi, czy płynie otrzewnowym, ale również w moczu chorych pacjentek, ponieważ jako białko o małej masie cząsteczkowej ulega przesączaniu w kłębuszkach nerkowych [Badgwell D, Lu Z, Cole L et al., *Urinary mesothelin provides greater sensitivity for early stage ovarian cancer than serum mesothelin, urinary hCG free beta subunit and urinary hCG beta core fragment*, Gynecol Oncol. (2007); 106(3):490–7.].

Wykrywanie biomarkerów chorób nowotworowych w moczu mogłoby mieć zastosowanie w szybkich, łatwych i tanich testach diagnostycznych ułatwiających wczesne rozpoznawanie, monitorowanie i diagnostykę nawrotów choroby.

Najczęściej stosowaną metodą oznaczania mezoteliny jest ELISA [Fontana V, Pistillo MP, Vigani A, Canessa PA, Berisso G, Giannoni U, Ferro P, Franceschini MC, Carosio R, Tonarelli M, Rossi C, Dessanti P, Roncella S. *Determination of Mesothelin Levels in Pleural Effusion Does Not Help Predict Survival of Patients With Malignant Pleural Mesothelioma*. Anticancer Res. (2019); 39(9):5219–5223; Fontana V, Pistillo M, Vigani A, Canessa P, Berisso G, Giannoni U, Ferro P, Franceschini M, Carosio R, Tonarelli M, Tonarelli M, et al, *Potential role of serum mesothelin in predicting survival of patients with malignant pleural mesothelioma*. Oncol Lett (2021, 21(2): 128].

Do oznaczania mezoteliny stosowano:

- immunosensor oparty na mikrowadze kwarcowej (nie testowano go na próbkach naturalnych lecz wyłącznie na roztworach standardowych) [Hem C. Joshi, Himanshu Kharkwal, Ajay Kumar, Piyush Kumar Gupta, *Development of a quartz crystal microbalance-based immunosensor for the early detection of mesothelin in cancer*, Sensors International 4 (2023) 100248],
- biosensor SPR z nanocząsteczkami złota (zastosowano go do wykrywania mezoteliny w płodowej surowicy bydłowej) [Erenildo Ferreira de Macedo, Lucca Silva Nascimento, Yanxia

Hou, Raphael Mathey, Dayane Batista Tada, *Simultaneous detection of CA-125 and mesothelin by gold nanoparticles in surface plasmon resonance*, Sensing and Bio-Sensing Research 43 (2024) 100609],

- biosensor fali akustycznej (testowano na próbkach supernatantu linii komórkowych raka trzustki) [Corso CD, Stubbs DD, Lee SH, Goggins M, Hruban RH, Hunt WD., *Real-time detection of mesothelin in pancreatic cancer cell line supernatant using an acoustic wave immunosensor*. Cancer Detect Prev. (2006);30(2): 180–7],
- mikroprzepływowy system testu immunologicznego (MIAS) do szybkiego półilościowego wykrywania poziomów MSLN w surowicy (testowano na próbkach surowicy pacjentów z rakiem trzustki) [Xiaoxiao Duan, Linlin Zhao, Heng Dong, Wang Zhao, Sixiu Liu, and Guodong Sui, *Microfluidic Immunoassay System for Rapid Detection and Semi-Quantitative Determination of a Potential Serum Biomarker Mesothelin*, ACS Sensors (2019), 4 (11), 2952–2957].

Na podstawie powyższych informacji, przeglądu dotychczasowych badań naukowych i analizy potrzeb diagnostycznych środowiska lekarskiego, stworzenie nowej ilościowej i bezznacznikowej metody oznaczania mezoteliny jest bardzo ważnym zagadnieniem badawczym o wysokim potencjale aplikacyjnym.

Rozwiązaniem jest konstrukcja immuno-biosensora specyficznego na białko mezoteliny, który współpracuje z Powierzchniowym Rezonansem Plazmonów w wersji obrazowej (SPRi) stanowiącym dla niego sposób detekcji.

Taką możliwość daje opracowanie immuno-biosensora współdziałającego z techniką Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji obrazowej (SPRi) jako metodą detekcji. Technika SPRi została zaprezentowana m.in. w pracach: F. Pillet, C. Romera, E. Trévisiol, S. Bellond, M.P Teulade-Fichoug, J.M. Francois, G. Prati, Leberre, *Surface plasmon resonance imaging (SPRi) as an alternative technique for rapid and quantitative screening of small molecules, useful in drug discovery* Sens. Actuators, B, (2011), 157:304–309; Shpacovitch V, Temchura V, Matrosovich M, Hamacher J, Skolnik J, Libuschewski P, Siedhoff D, Weichert F, Marwedel P, Müller H, Überla K, Hergenröder R, Zybin A., *Application of surface plasmon resonance imaging technique for the detection of single spherical biological submicrometer particles*. Anal Biochem. (2015), 486:62–9; A. Sankiewicz, L. Romanowicz, P. Laudanski, B. Zelazowska-Rutkowska, B. Puzan, B. Cylwik, 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. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Matuszczak, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz. *SPRi biosensors for quantitative determination of matrix metalloproteinase-2*, Anal Methods. (2017), 9:2407–2414; A. Sankiewicz, L. Romanowicz, M. Pyc, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz, *SPR imaging biosensor for the quantitation of fibronectin concentration in blood samples*, J Pharm Biomed Anal. 2018, 150:1–8; 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. (2019), 20:2166; B. Szymanska, Z. Lukaszewski, K. Hermanowicz-Szamatowicz, E. Gorodkiewicz *An Immunosensor for the determination of carcinoembryonic antigen by Surface Plasmon Resonance imaging*, Anal. Biochem., 2020, 609:113964; Oldak L, Sankiewicz A, Zelazowska-Rutkowska B, Cylwik B, Lukaszewski Z, Skoczylas M, Gorodkiewicz E. *Two SPRi biosensors for the determination of cathepsin S in blood plasma*. Talanta. (2021), 225:121900; Zeng Y, Zhou J, Sang W, Kong W, Qu J, Ho HP, Zhou K, Gao BZ, Chen J, Shao Y. *High-Sensitive Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensor Based on Dual-Wavelength Differential Method*. Front Chem. (2021), 9:801355. Oldak, L.; Leśniewska, A.; Zelazowska-Rutkowska, B.; Latoch, E.; Lukaszewski, Z.; Krawczuk-Rybak, M.; Gorodkiewicz, E.; *An Array SPRi Biosensor for Simultaneous VEGF-A and FGF-2 Determination in Biological Samples.*, Appl. Sci. (2022), 12, 12699; Sankiewicz, A.; Zelazowska-Rutkowska, B.; Gorska, E.; Hermanowicz, A.; Gorodkiewicz, E. *New Biosensor for Determination of Neuropilin-1 with Detection by Surface Plasmon Resonance Imaging*. Sensors (2023), 23, 4118.

Biosensor wychwytuje oznaczaną substancję z roztworu. Sygnał analityczny mierzony przez aparaturę SPRi jest odpowiedzią na przyrost masy na powierzchni biosensora. Biosensor taki charakteryzuje się prostotą wykonania i daje możliwość przeprowadzenia całego procesu pomiarowego w sposób szybki i nieskomplikowany bez stosowania jakichkolwiek znaczników.

Dlatego rozwiązanie to może konkurować z obecnie stosowanymi metodami ilościowych oznaczeń substancji biologicznie aktywnych szczególnie w bogatej matrycy jakim są płyny ustrojowe orga-

nizmu ludzkiego Według obecnego stanu techniki istnieją liczne biosensory SPRi umożliwiające oznaczanie stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe publikacje JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052, PL222548, czy też P.439848.

Daje to szansę rozwój i upowszechnienie pomiarów stężenia związków biologicznie aktywnych istotnych diagnostycznie. Warunkiem tego jest skonstruowanie odpowiednich biosensorów SPRi, które selektywnie będą wychwytywały analit nawet z bogatej matrycy jakim są płyny ustrojowe organizmu ludzkiego. Obecnie znane są różnego rodzaju biosensory wykorzystywane do oznaczania stężeń związków biologicznie aktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy wynalazków JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052, PL222548, PL235045, P430495, P.439848 czy P.441141. Opisywany wynalazek wpisuje się w nurt rozwiązań. Dotychczas jednak nie opracowano biosensora SPRi do oznaczania mezoteliny.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania mezoteliny w ludzkim materiale biologicznym (osocze, surowica krwi, ślina), dostosowany do współpracy z techniką Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji obrazowej (Imaging). Bioreceptorem w opracowanym biosensorze jest królicze monoklonalne przeciwciało czułe na mezotelinę. Opracowany biosensor 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 bioreceptorową. Bioreceptor (w/w przeciwciało) jest zimmobilizowane na powierzchni złota wiązaniem kowalencyjnym za pośrednictwem linkera – cysteaminy.

Przedmiot wynalazku uwidoczniiony jest na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat biosensora wraz z przekrojem pionowy przez miejsce aktywne.

Biosensor składa się z płytki szklanej 1 pokrytej warstwą tytanu 2 oraz złota 3. Na warstwie złota znajduje się siatka polimeru 4 tworzącą miejsce aktywne. Warstwa receptorowa składa się z linkera – cysteaminy 5 oraz króliczego monoklonalnego przeciwciała czułego na mezotelinę 6 połączonego kowalencyjnie z cysteaminą. Bioreceptor specyficznie wyłapuje mezotelinę 7 z badanego roztworu.

Biosensor jest specyficzny, tzn. wychwytuje tylko mezotelinę spośród setek innych substancji obecnych w płynach ustrojowych. Biosensor współpracujący z aparaturą SPRi zapewnia pomiary w zakresie stężeń dostosowanym do poziomu występującego w krwi i innych płynach ustrojowych. Na fig. 2 przedstawiona jest krzywa kalibracyjna oraz zakres prostoliniowej zależności sygnału SPRi od stężenia mezoteliny. Biosensor zapewnia dobrą precyzję i dokładność pomiaru.

Biosensor w przykładzie działania został wykorzystany do oznaczania mezoteliny w serii próbek osocza krwi pacjentek ze stwierdzoną endometriozą. Próbka osocza krwi pacjentek ze stwierdzoną endometriozą jest rozcieńczana buforem PBS w stosunku 1:9. Na jedno z aktywnych miejsc biosensora jest наносzone 3 μ L tego roztworu. Po upływie 10 min próbka jest 1-krotnie przemywana buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRi. Podczas opracowania wyników наносzona jest wirtualna maska składająca się z 12 punktów, przyjętych jako 12 niezależnych pomiarów. Stężenie mezoteliny odczytuje się z krzywej kalibracyjnej oraz uwzględnia rozcieńczenie.

Przykład:

Z serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzoną endometriozą otrzymano następujące wyniki po uwzględnieniu rozcieńczenia:

Próbka 1	sygnał SPRi	8724.96	wynik	7.493 ng/mL
Próbka 2	sygnał SPRi	7948.75	wynik	6.822 ng/mL
Próbka 3	sygnał SPRi	6828.97	wynik	5.854 ng/mL
Próbka 4	sygnał SPRi	7705.82	wynik	6.612 ng/mL
Próbka 5	sygnał SPRi	5721.91	wynik	4.897 ng/mL
Próbka 6	sygnał SPRi	8742.32	wynik	7.508 ng/mL
Próbka 7	sygnał SPRi	5379.50	wynik	4.601 ng/mL
Próbka 8	sygnał SPRi	10560.81	wynik	9.080 ng/mL
Próbka 9	sygnał SPRi	3488.13	wynik	2.966 ng/mL

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania mezoteliny w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który stanowi płytkę szklaną pokrytą warstwą złota na podłożu tytanu oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową, **znamienny tym**, że warstwę receptorową stanowi królicze monoklonalne przeciwciało specyficzne na mezotelinę (6), zimmobilizowane na powierzchni złota (3) pokrytej siatką polimeru (4), tworzącą miejsce aktywne, przy czym przeciwciało (6) połączone jest z warstwą złota (3), umieszczoną na warstwie tytanu (2) pokrywającą płytkę szklaną (1), wiązaniem kowalencyjnym za pośrednictwem linkera w postaci cysteaminy (5).

Rysunki

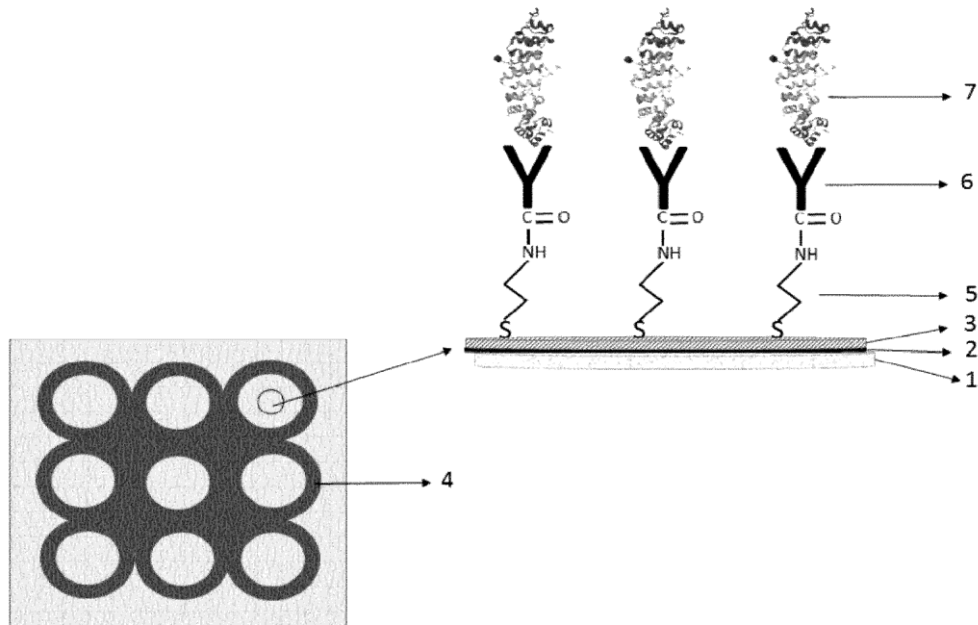


fig.1

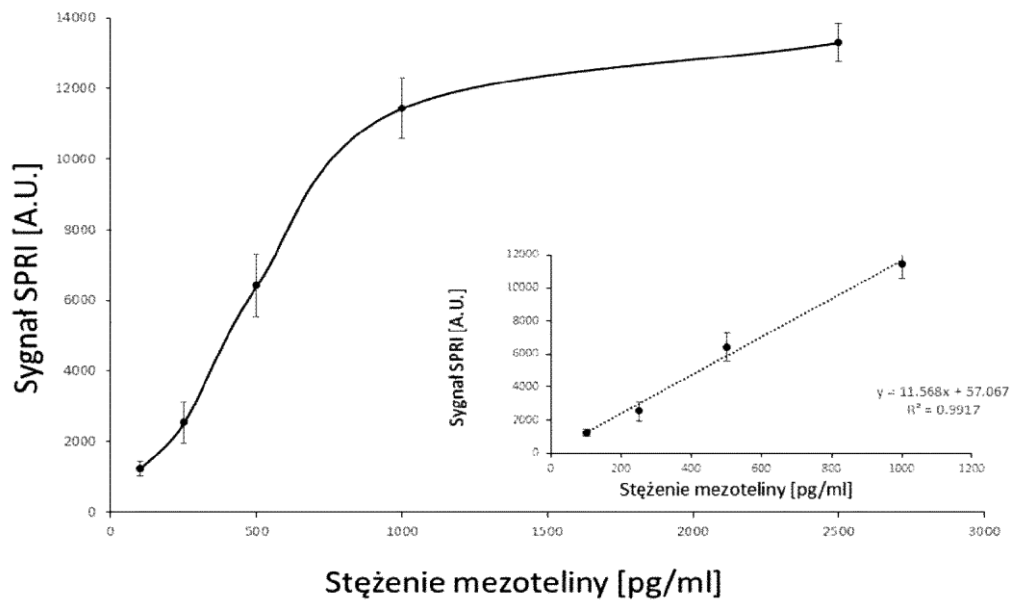


fig. 2