

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 246108 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **441547**

(22) Data zgłoszenia: **2022.06.26**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.12.27 BUP 52/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.12.02 WUP 49/2024**

(51) MKP:

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL
UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU, Białystok, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
ANNA SANKIEWICZ, Białystok, PL
BOGDAN WYRWAS, Poznań, PL
ZENON ŁUKASZEWSKI, Kamionki, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Walkowiak, Dobra, PL

(54) Tytuł:

**Biosensor do oznaczania neuropiliny-1 techniką matrycowego powierzchniowego
rezonansu plazmonów w wersji Imaging**

PL 246108 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do oznaczania neuropiliny-1 techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging.

Neuropilina-1 jest markerem raka piersi (Rachner, T.D. Kasimir-Bauer, S., Goebel, A., Erdmann, K., Hoffmann, O., Rauner, M., Hofbauer, L.C., Kimmig, R., Bittner, A.-K., *Soluble Neuropilin-1 is an independent marker of poor prognosis in early breast cancer*, J. Cancer Res.Clin. Oncol. (2021) 147:2233–2238. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03635-1>). Jest także ważnym koreceptorem ataku wirusa SARS-CoV-2 na zaatakowaną komórkę (Gudowska-Sawczuk, M., Mroczko, B. *The Role of Neuropilin-1 (NRP-1) in SARS-CoV-2 Infection: Review*. J. Clin. Med. 2021, 10, 2772. <https://doi.org/10.3390/jcm10132772>).

Biomarker odgrywa istotną rolę zarówno w regulacji angiogenezy podczas rozwoju embrionalnego, jak i podczas patologicznej angiogenezy w guzach nowotworowych. Angiogeneza jest procesem tworzenia naczyń krwionośnych. Neuropilina-1 promuje wzrost, migrację, inwazję i przeżycie komórek nowotworowych. [Liu SD, Zhong LP, He J, Zhao YX. *Targeting neuropilin-1 interactions is a promising anti-tumor strategy*. Chin Med J (Engl). 2020, 134(5): 508–517].

Neuropilina-1 jest białkiem o masie cząsteczkowej 246 kDa a jej poziom stężenia w surowicy krwi wynosi $1,88 \pm 0,52$ nM to jest $130,8 \pm 36,2$ ng/mL (Rachner, T.D. Kasimir-Bauer, S., Goebel, A., Erdmann, K., Hoffmann, O., Rauner, M., Hofbauer, L.C., Kimmig, R., Bittner, A.-K., *Soluble Neuropilin-1 is an independent marker of poor prognosis in early breast cancer*, J. Cancer Res.Clin. Oncol. (2021) 147:2233–2238. <https://doi.org/10.1007/s00432-021-03635-1>).

Neuropilina-1 jest oznaczana za pomocą testów immunoenzymatycznych ELISA z granicą oznaczalności 6,3 ng/mL.

Alternatywną do oznaczania neuropiliny-1 za pomocą testów ELISA może być zastosowanie techniki matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging. 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. Świadczą o tym m.in. liczne wynalazki na biosensory.

Według obecnego stanu techniki istnieją liczne biosensory SPRi umożliwiające oznaczanie stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy: JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052, PL222548, PL222549, PL234488, PL235043, 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. opublikowane ostatnio prace eksperymentalne opublikowane w prestiżowych czasopismach:

Bogdan, S.; Puścion-Jakubik, A.; Klimiuk, K.; Socha, K.; Kochanowicz, I.; 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. <https://doi-org-10000387b5567.han3.library.put.poznan.pl/10.3390/jcm11020412>

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. <https://doi-org-10000387b5567.han3.library.put.poznan.pl/10.3390/app11177835>

Matuszczak, E.; Cwalina, I.; Tylicka, M.; Wawrzyn, K.; Nowosielska, M.; Sankiewicz, A.; Ołdak, 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. <https://doi-org-10000387b5567.han3.library.put.poznan.pl/10.3390/jcm9123971>

Komarowska, M.; Szymańska, B.; Ołdak, 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, <https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.10.004>

Technika matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging została omówiona na tle innych podobnych osiągnięć w pracach przeglądowych: [Gorodkiewicz E., Łukaszewski Z., Recent Progress in Surface Plasmon Resonance Biosensors (2016 to Mid-2018), Biosensors, 2018, 4,

132.] [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 neuropiliny-1.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania neuropiliny-1 w ludzkim materiale biologicznym (osocze, surowica krwi, ślina), dostosowany do współpracy z techniką matrycowego Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów w wersji obrazowej (Imaging). Opracowany biosensor wykorzystuje mysie monoklonalne przeciwciała specyficzne wobec neuropiliny-1 jako receptor i spełnia warunki analityczne pod względem zakresu pomiarowego, specyficzności, precyzji i dokładności pomiaru. Biosensor według wynalazku zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą tytanu oraz 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 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.

Biosensor do specyficznego oznaczania neuropiliny-1 w przykładzie realizacji uwidoczniiony jest na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat biosensora i przekrój pionowy przez miejsce aktywne, a fig. 2 przedstawia zakres prostoliniowy zależności sygnału SPRi od stężenia neuropiliny-1.

Biosensor w przykładzie – jak przedstawiono na fig. 1 – składa się z podzielonej na partycje 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 wobec neuropiliny-1 połączonego kowalencyjnie z linkerem-cysteaminą. Warstwa receptorowa specyficznie wyłapuje neuropilinę-1 (7) z badanego roztworu.

Biosensor został wykorzystany do oznaczania neuropiliny-1 w serii próbek osocza pacjentów chorych na stwardnienie rozsiane. Po 3 μ L osocza z 9 różnych próbek w rozcieńczeniu 1:200 nanoszono na poszczególne miejsca aktywne. Po upływie 10 min miejsca aktywne 6-krotnie przemywano buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzono sygnał SPRi. Stężenie neuropiliny-1 odczytano z krzywej kalibracyjnej i po uwzględnieniu rozcieńczenia uzyskano następujące wyniki:

Próbka 1	sygnał SPRi	3427	wynik 141 ng/ml
Próbka 2	sygnał SPRi	4108	wynik 202 ng/ml
Próbka 3	sygnał SPRi	5245	wynik 305 ng/ml
Próbka 4	sygnał SPRi	4542	wynik 241 ng/ml
Próbka 5	sygnał SPRi	4584	wynik 245 ng/ml
Próbka 6	sygnał SPRi	3974	wynik 190 ng/ml
Próbka 7	sygnał SPRi	6034	wynik 376 ng/ml
Próbka 8	sygnał SPRi	5150	wynik 296 ng/ml
Próbka 9	sygnał SPRi	5468	wynik 325 ng/ml

Zastrzeżenie patentowe

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

Rysunki

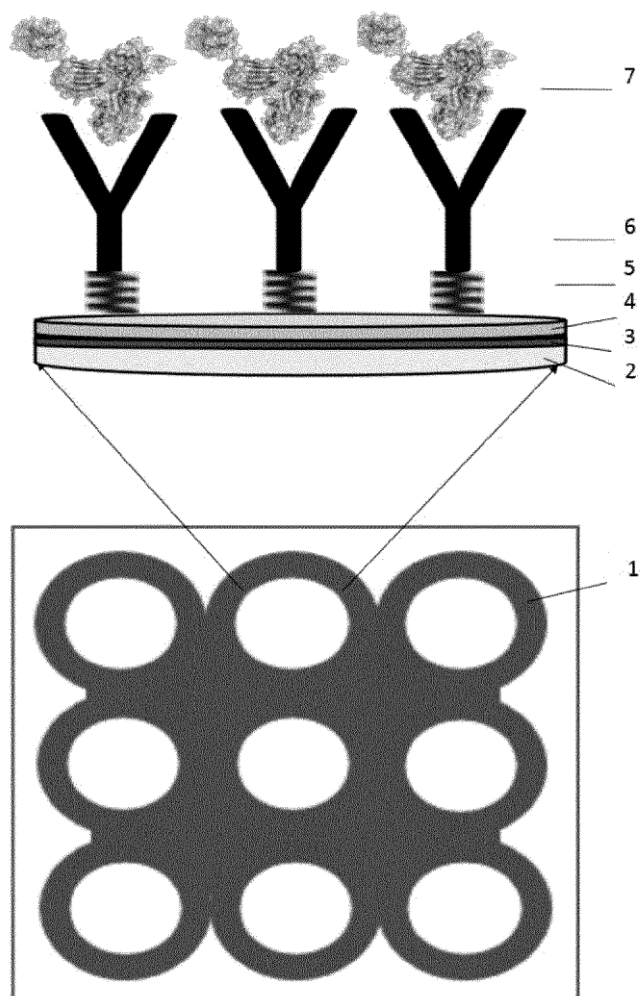


fig.1

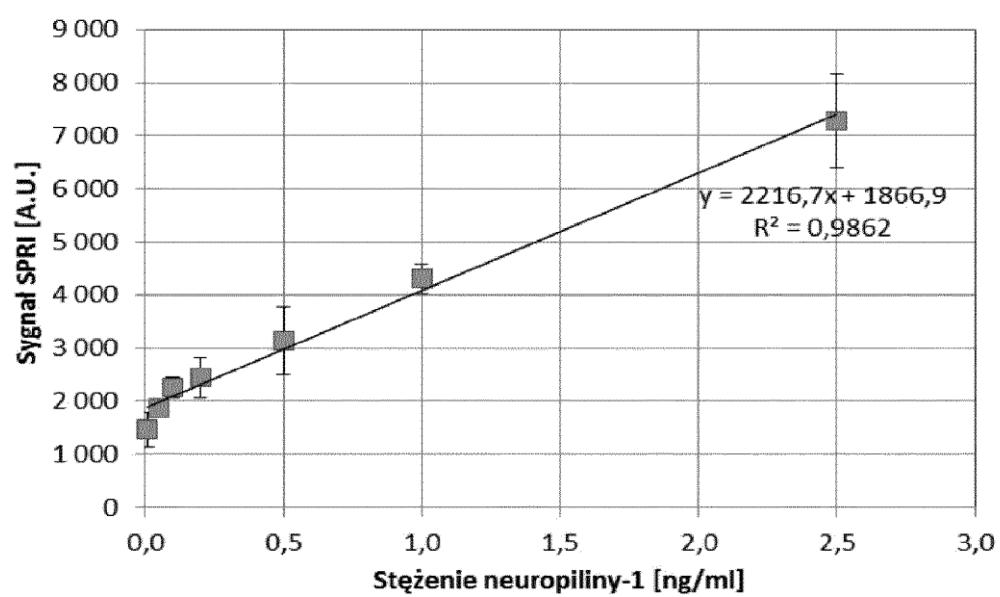


fig. 2