

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 249082 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438864**

(22) Data zgłoszenia: **2021.09.01**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.03.06 BUP 10/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2026.02.23 WUP 08/2026**

(51) MKP:

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL

UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU,

Białystok, PL

POLITECHNIKA BIAŁOSTOCKA, Białystok, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

PIOTR MROZEK, Kleosin, PL

EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL

PAWEŁ FALKOWSKI, Białystok, PL

BOGDAN WYRWAS, Poznań, PL

ZENON ŁUKASZEWSKI, Kamionki, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Walkowiak, Dobra, PL

(54) Tytuł:

Chip immunosensora dla powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji imaging

PL 249082 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest chip immunosensora dla powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji imaging, zawierający aktywne grupy aminowe oraz foliową maskę separującą pola pomiarowe. Chip jest przeznaczony do wytwarzania immunosensorych przez kowalencyjne wiązanie z grupami karboksylowymi przeciwciała według protokołu NHS/EDS.

Techniki Powierzchniowego Rezonansu Plazmonów (SPR) stopniowo zwiększają zakres możliwości pomiarowych (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.* 408(2016) 5269–5276; A. Sankiewicz, Z. Lukaszewski, K. Trojanowska, E. Gorodkiewicz, *Determination of collagen type IV by Surface Plasmon Resonance Imaging using a specific biosensor*, *Anal Biochem.* 515(2016) 40–46; A. Sankiewicz, A. Markowska, Z. Lukaszewski, B. Puzan, E. Gorodkiewicz, *Methods for 20S Immunoproteasome and 20S Constitutive Proteasome Determination Based on SPRI Biosensors*, *Cell. Molec. Bioengin.* 10(2017) 174–185.40–46; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Gorodkiewicz, *The development of a matrix metalloproteinase-1 biosensor based on the surface plasmon resonance imaging technique*, *Anal. Methods.* 8(2016) 6428–6435; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Matuszczak, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz, *SPRI biosensors for quantitative determination of matrix metalloproteinase-2*, *Anal. Methods.* 9(2017) 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.* 150(2018)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.*;20(2019)2166) i zastosowań w badaniach klinicznych (A. Sankiewicz, T. Guszcz, R. Mena-Hortelano, K. Zukowski, E. Gorodkiewicz E, *Podoplanin serum and urine concentration in transitional bladder cancer*, *Cancer Biomark.* 16(2016) 343–350; E. Matuszczak, M. Tylicka, A. Hermanowicz, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, *Application of SPR imaging biosensor for the measurement of 20S proteasomes in blood plasma of children with thermal injury*, *Annal. Clin. Lab. Sci.* 46(2016) 407–411; A. Tokarzewicz, T. Guszcz, A. Onopiuk, R. Kozłowski, E. Gorodkiewicz, *Utility of cystatin C as a potential bladder tumour biomarker confirmed by surface plasmon resonance technique*, *Indian J. A Med. Res.* 218(2018) 46–50; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1) in serum of children after thermal injury*, *Adv. Med. Sci.* 62(2017) 83–86; A. Weremijewicz, E. Matuszczak, A. Sankiewicz, M. Tylicka, M. Komarowska, A. Tokarzewicz et al., *Matrix metalloproteinase-2 and its correlation with basal membrane components laminin-5 and collagen type IV in paediatric burn patients measured with Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) biosensors*, *Burns*, 44(2018) 931–940; D. Toliczenko-Bernatowicz, E. Matuszczak, M. Tylicka, B. Szymańska, M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, et al. *Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) in boys with cryptorchidism*, *Plos One*, 13(2018) e0191806; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Concentration of Proteasome in the Blood Plasma of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRP*, *World J Surg.* 42(2018) 2259–2264; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Tokarzewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Concentration of UHCL1 in the Serum of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRP and Prealbumin*, *J Investig Surg.* 31(2018) 136–141; D. Toliczenko-Bernatowicz, E. Matuszczak, M. Tylicka, A. Sankiewicz, M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, et al. *20S proteasome in the blood plasma of boys with cryptorchidism*, *J Endocrinol Investig.* 41(2018) 1103–1106; E. Matuszczak, A. Sankiewicz, W. Debek, Gorodkiewicz, R. Milewski, Hermanowicz, *Immunoproteasome in the blood plasma of children with acute appendicitis, and its correlation with proteasome and UCHL1 measured by SPR imaging biosensors*, *Clin Exper. Immun.* 191(2018) 125–132; E. Matuszczak, M. Komarowska, M. Tylicka, W. Debek, E. Gorodkiewicz, A. Tokarzewicz, et al, *Determination of the concentration of cathepsin B by SPRI biosensor in children with appendicitis, and its correlation with proteasomes*, *Adv. Clin. Exp. Med.* 27(2018)1529–1534; R. Grzywa, E. Gorodkiewicz, E. Burchacka, A. Lesner, P. Laudanski, Z. Lukaszewski, M. Sienczyk, *Determination of cathepsin G in endometrial tissue using a surface plasmon resonance imaging biosensor with tailored phosphonic inhibitor*, *Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol.* 182(2014) 38–42; P. Laudanski, E. Gorodkiewicz, B. Ramotowska, R. Charkiewicz, M. Kuzmicki, J. Szamatowicz, *Determination of cathepsins B, D and G concentration in eutopic proliferative endometrium of women with endometriosis*

by the surface plasmon resonance imaging (SPRI) technique, *Eur. J. Obstetr. Gynecol. Reprod. Biol.* 169(2013) 80–83).

Istotnym elementem procesu pomiarowego SPR jest biosensor budowany na bazie chipa – najczęściej płytki szklanej pokrytej złotem. Większość biosensorów stosowanych łącznie z SPR zawiera warstwę receptorową w postaci przeciwciała specyficznego na oznaczany marker połączonego z warstwą złota za pośrednictwem linkera. W celu ułatwienia i przyspieszenia procesu pomiarowego coraz częściej stosuje się gotowe chipy pokryte warstwą linkera. Są to chipy CM3, CM4, CM5 i CM7 produkcji firmy BIACORE AB, w których powierzchnia złota jest pokryta karboksylowanym dekstranem.

W celu wytworzenia biosensora wystarczy zimmobilizować odpowiednie przeciwciała stosując procedurę NHS/EDS. Przykłady takiego rozwiązania są przedstawione w pracach: *Sahu V, Gupta A., Kumar R, Gupta T, Mohan A., Dey S., Quantification of Rac1 and Rac1b in serum of non small cell lung cancer by label free real time assay. Clin. Chim. Acta.* 460(2016) 231–235; *Banerjee J, Pradhan R, Gupta A, Kumar R, Sahu V, Upadhyay AD, Chaterjee P, Dwivedi S., Dey S., Dey A. B., CDK4 in lung, and head and neck cancers in old age: evaluation as a biomarker, Clin. Transl. Oncol.* 19(2017) 571–578; *Kim D.-H.; Cho I-H.; Park J-N; Paek S-H.; Cho H-M.; Paek, S-H. Semi-continuous, real-time monitoring of protein biomarker using a recyclable surface plasmon resonance sensor, Biosens. Bioelectr.* 88(2017) 232–239).

Stosowanie złota do tworzenia biosensorów wynika z właściwości powierzchniowych tego pierwiastka, a także z silnego sygnału SPR. Jednak jeszcze silniejszy sygnał SPR uzyskuje się stosując chip pokryty metalicznym srebrem (*A. S. Baburin, A. M. Merzlikin, A. V. Baryshev, I. A. Ryzhikov, Y. V. Panfilov, I. A. Rodionov, Silver-based plasmonics: golden material platform and application challenges, Opt. Mater. Express* 2019; 9(2):611).

Jednak powierzchnia srebra stosunkowo łatwo ulega utlenieniu, co utrudnia stosowanie chipów pokrytych srebrem do tworzenia biosensorów SPR (*H. U. Yang, J. D'Archangel, M. L. Sundheimer, E. Tucker, G. D. Boreman, M. B. Raschke, Optical dielectric function of silver, Phys. Rev. B* 2015;91:235137).

W celu zwiększenia wydajności procedury pomiarowej, stosowane są biochipy w formacie macierzowym (*Array Format SPR Chip*). Panele biosensorów tego typu są wyposażone w liczne pola pomiarowe, wykonywane różnymi metodami, np. przez osadzenie na szkle w regularnych odstępach izolowanych od siebie warstw metalu o kształcie kołowym lub kwadratowym (*Templier V, Livache T, Boisset S, Maurin M, Slimani S, Mathey R, Roupioz Y, Biochips for Direct Detection and Identification of Bacteria in Blood Culture-Like Conditions, Sci Rep* 2017;7(1):9457; *Michael D. Zordan, Meggie MG Grafton, Kinam Park, James F. Leary, The design of a microfluidic biochip for the rapid, multiplexed detection of foodborne pathogens by surface plasmon resonance imaging, Proc. of SPIE Vol. 7553 755307-1; Yong Cao, Bethany Griffith, Prasanna Bhomkar, David S. Wishartb, Mark T. McDermott, Functionalized gold nanoparticle-enhanced competitive assay for sensitive small-molecule metabolite detection using surface plasmon resonance, Analyst, 2018, 143, 289–296*), przez wykorzystanie nanocząstek lub kryształów fotonicznych o zróżnicowanym kształcie. Jeden ze sposobów polega na naniesieniu na jednorodną cienką warstwę złota maski (siatki) fotopolimerowej w formie regularnie rozmieszczonych i odseparowanych od siebie pól pomiarowych (*E. Gorodkiewicz, E. Regulska, SPR Imaging Biosensor for Aspartyl Cathepsins: Sensor Development and Application for Biological Material, Protein & Peptide Letters, 2010, 17, 1148–1154*).

Istnieje możliwość jednoczesnej realizacji pojedynczych pomiarów oddzielnie w każdym polu (oknie maski), szczególnie przy wykorzystaniu metody SPR w wersji Imaging (SPRI) (*Michael D. Zordan, Meggie M. G. Grafton, Ghanashyam Acharya, Lisa M. Reece, Christy L. Cooper, Arthur I. Aronson, Kinam Park, James F. Leary, Detection of Pathogenic E. coli O157:117 by a Hybrid Microfluidic SPR and Molecular Imaging Cytometry Device, Cytometry Part A, 75A: 155–162, 2009*). Wydajność procedury rośnie stosownie do liczby pól na powierzchni biosensora.

Rozwiązanie według wynalazku przedstawia chip zawierający na powierzchni grupy aminowe, który jest przygotowany do wytworzenia immunosensora przez przyłączenie stosowanego przeciwciała według procedury NHS/EDS.

Jest to korzystniejsze rozwiązanie w odniesieniu do dostępnych komercyjnie chipów serii CM np. CM5, które posiadają na swojej powierzchni grupy karboksylowe. Grupy aminowe są korzystniejszą propozycją ponieważ przeciwciała po immobilizacji są korzystniej zorientowane. Przeciwciała mają zakumulowane grupy karboksylowe z przeciwnej strony niż grupy aktywne. Dlatego immobilizacja oparta o chip zawierający powierzchniowe grupy aminowe prowadzi do korzystniejszego ustawienia przeciwciała w biosensorze.

Ponadto zastrzegane rozwiązanie zawiera warstwę metaliczną składającą się z podkładu srebra oraz powierzchniowej warstwy złota. Taki układ wykazuje silniejszy sygnał SPR charakterystyczny dla srebra, zachowując zalety powierzchniowej warstwy złota (brak utleniania, reaktywność z tiolami).

Ponadto powierzchnia chipa jest wariantowo dzielona na pewną liczbę pól pomiarowych dzięki separacji powierzchni na pola pomiarowe przez folię polipropylenową umieszczoną na podłożu stałego spoiwa akrylowego na bazie wody.

Takie rozwiązanie umożliwia równoczesny pomiar kilku próbek lub kilku powtórzeń tej samej próbki lub utworzenia panelu kilku biosensorów.

Istotą wynalazku jest chip immunosensora dla powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji imaging przeznaczony do wytwarzania immunosensorów przez kowalencyjne wiązanie z grupami karboksylowymi przeciwciała według protokołu NHS/EDS. Chip zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą metaliczną z warstwą roboczą oraz warstwą zewnętrzną z co najmniej jednym polem pomiarowych.

Warstwę metaliczną umieszczoną na płytce szklanej, korzystnie BK7, stanowi warstwa metalicznego chromu, korzystnie o grubości 1 nm, następnie warstwa srebra korzystnie o grubości 35 nm oraz umieszczona na niej warstwa złota, korzystnie o grubości 5 nm.

Powierzchnia złota pokryta jest zimmobilizowaną cysteaminą (warstwa robocza).

Zewnętrzną warstwę umieszczoną na warstwie złota pokrytej zimmobilizowaną cysteaminą stanowi folia polipropylenowa, korzystnie o grubości 30 μm i gramaturze 28 g/m^2 o wytrzymałości na rozciąganie min. 130 kN/m z pośrednią warstwą adhezyjną ze stałego akrylowego spoiwa na bazie wody, korzystnie o przyczepności 9N.

Korzystnym wariantem chipa jest układ, w którym warstwa zewnętrzna podzielona jest na kilka pól pomiarowych z wykorzystaniem okien w warstwie zewnętrznej. Każde okno stanowi w tym układzie pole pomiarowe.

Chip immunosensora dla powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji imaging przeznaczony do wytwarzania immunosensorów przez kowalencyjne wiązanie z grupami karboksylowymi przeciwciała według protokołu NHS/EDS w przykładzie realizacji pokazano na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schematyczny przekrój chipa, a fig. 2 krzywą kalibracyjną katepsyny S uzyskaną z zastosowaniem immunosensora na bazie chipa.

Chip immunosensora dla powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji imaging przeznaczony do wytwarzania immunosensorów przez kowalencyjne wiązanie z grupami karboksylowymi przeciwciała według protokołu NHS/EDS zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą metaliczną i warstwą receptorową oraz warstwą zewnętrzną.

Warstwę metaliczną umieszczoną na płytce szklanej 1 – w przykładzie BK7, stanowi warstwa metalicznego chromu 2 o grubości 1 nm, następnie warstwa srebra 3 o grubości 35 nm oraz umieszczona na niej warstwa złota 4 o grubości 5 nm.

Powierzchnia złota pokryta jest zimmobilizowaną cysteaminą.

Zewnętrzną warstwę umieszczoną na warstwie złota pokrytej zimmobilizowaną cysteaminą stanowi folia polipropylenowa 6 o grubości 30 μm i gramaturze 28 g/m^2 o wytrzymałości na rozciąganie min. 130 kN/m z pośrednią warstwą adhezyjną 5 ze stałego akrylowego spoiwa na bazie wody o przyczepności 9N, dzieląca powierzchnię chipa, z wykorzystaniem okien 7 w warstwie zewnętrznej, na kilka pól pomiarowych.

Chip w przykładzie działania został wykorzystany do wytworzenia immunosensora do oznaczania katepsyny S.

Warstwę receptorową immunosensora tworzy monoklonalne szczurze przeciwciało specyficzne na katepsynę S. Zaktywowanie przeciwciała uzyskano przez zmieszanie roztworu przeciwciała o stężeniu 20 ng mL^{-1} z 250 nM EDS i 250 nM NHS w obecności buforu węglanowego o pH 8.5. Tak uzyskano aktywację przeciwciała. Aktywowany roztwór przeciwciała naniesiono na robocze miejsca chipa i pozostawiono na 60 min. Powierzchnie chipa spłukano kilkakrotnie wodą redestylowaną, po czym naniesiono roztwór BSA o stężeniu 1 ng mL^{-1} w celu deaktywacji miejsc na powierzchni chipa nie obsadzonych przez przeciwciało. Uzyskany immunosensor przemyto kilkakrotnie wodą redestylowaną i osuszono strumieniem argonu. Wykonano pomiar SPRi stanowiący wynik odniesienia. Następnie naniesiono roztwór katepsyny S o znanym stężeniu pozostawiając na 10 min, po czym chip 6-krotnie przemyto buforem HBS-ES oraz wodą redestylowaną, wysuszono strumieniem argonu i ponownie wykonano pomiar SPRi. Wyniki serii pomiarów roztworów katepsyny S o stężeniach od 0,1 do 1,5 ng/mL zabrano w Tabeli 1 i naniesiono na fig. 2. Liniowość uzyskanej krzywej kalibracyjnej świadczy o prawidłowej pracy otrzymanego immunosensora.

Tabela 1

C katepsyna S [ng/mL]	Sygnal SPRI	SD
0,1	7144	130
0,5	8104	417
1	9492	169
1,5	11077	158

Krzywa kalibracyjna katepsyny S uzyskana z zastosowaniem immunosensora na bazie bimetalicznego chipa (fig. 2).

Zastrzeżenia patentowe

1. Chip immunosensora dla powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji imaging, przeznaczony do wytwarzania immunosensora przez kowalencyjne wiązanie z grupami karboksylowymi przeciwciała według protokołu NHS/EDS, zawierający płytkę szklaną pokrytą warstwą metaliczną z warstwą roboczą oraz warstwą zewnętrzną z co najmniej jednym polem pomiarowym **znamienny tym**, że warstwę metaliczną umieszczoną na płytce szklanej (1), korzystnie BK7, stanowi warstwa metalicznego chromu (2), korzystnie o grubości 1 nm, następnie warstwa srebra (3), korzystnie o grubości 35 nm oraz umieszczona na niej warstwa złota (4), korzystnie o grubości 5 nm, przy czym powierzchnia złota pokryta jest zimmobilizowaną cysteaminą, a zewnętrzną warstwę umieszczoną na warstwie złota pokrytej zimmobilizowaną cysteaminą stanowi folia polipropylenowa (6), korzystnie o grubości 30 μm i gramaturze 28 g/m^2 o wytrzymałości na rozciąganie min. 130 kN/m z pośrednią warstwą adhezyjną (5) ze stałego akrylowego spoiwa na bazie wody, korzystnie o przyczepności 9N.
2. Chip immunosensora według zastrz. 1 **znamienny tym**, że warstwa zewnętrzna posiada kilka pól pomiarowych i podzielona jest z wykorzystaniem okien (7) w warstwie zewnętrznej.

Rysunki

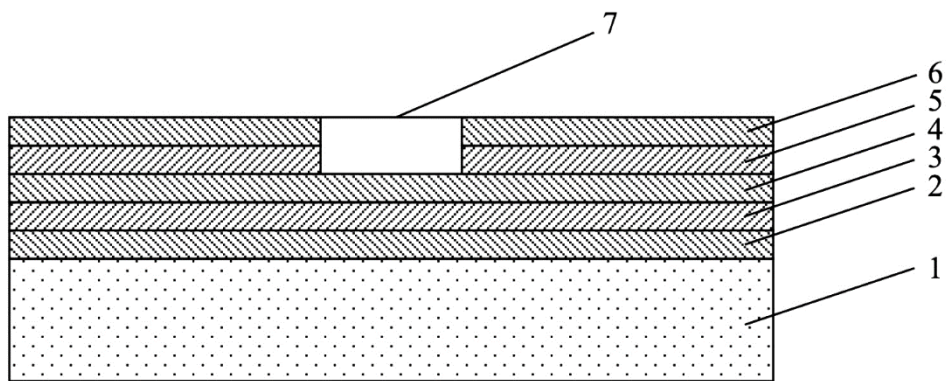


fig. 1

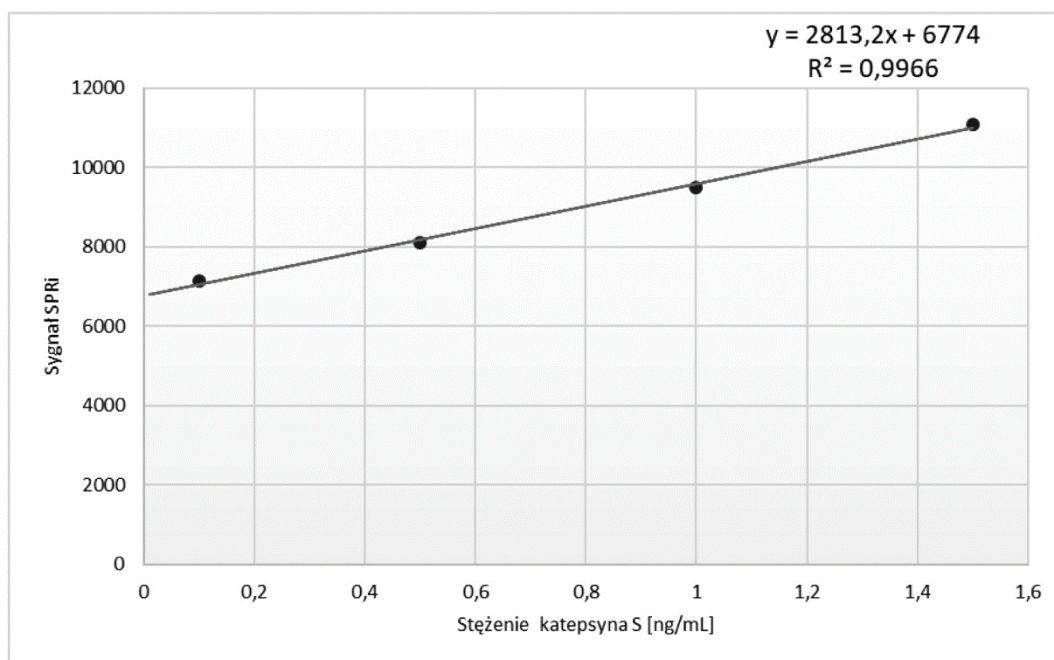


fig. 2