

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 244508 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439230**

(22) Data zgłoszenia: **2021.10.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.04.17 BUP 16/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.02.05 WUP 06/2024**

(51) MKP:

G01N 33/574 (2006.01)

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:

BEATA SZYMAŃSKA, Krasne Małe, PL
EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
BOGDAN WYRWAS, Poznań, PL
ZENON ŁUKASZEWSKI, Kamionki, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Walkowiak, Dobra, PL

(54) Tytuł:

Panel biosensorów ginekologiczno-onkologicznych do równoczesnego specyficznego oznaczania stężenia biomarkerów w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging

PL 244508 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest panel biosensorów ginekologiczno-onkologicznych do równoczesnego specyficznego oznaczania stężenia biomarkerów w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging w celu diagnostyki raka jajnika i innych schorzeń natury ginekologicznej.

Diagnostyka dokonywana na podstawie stężenia biomarkerów w płynach ustrojowych takich jak surowica lub osocze krwi, mocz, ślina, płyn mózgowo-rdzeniowy jest określana jako ciekła biopsja. Ma ona stanowić alternatywę do inwazyjnej biopsji polegającej na pobraniu wycinków tkanek. Oznaczanie stężenia biomarkerów w płynach ustrojowych w coraz większym stopniu stanowi podstawę skutecznej diagnostyki. Oczekuje się, że stężenie biomarkera będzie umożliwiało wykrycie choroby, a ponadto pozwoli na określenie stadium choroby oraz skuteczności terapii. Niestety, znane i stosowane obecnie biomarkery nie spełniają pokładanych oczekiwań w pełni. Oczekuje się, że skuteczność wykrycia choroby będzie 100-procentowa a jednocześnie – całkowity brak wyników fałszywie pozytywnych. Brak takich biomarkerów powoduje, że diagnostyka odwołuje się do wyników dwóch lub trzech biomarkerów. Przykładem takiego podejścia jest algorytm ROMA (*risk of ovarian malignancy algorithm*), obliczany na podstawie wyników dwóch biomarkerów CA-125 and HE 4.

Stosunkowo często ciekła biopsja jest instrumentem diagnostycznym w zakresie chorób ginekologiczno-onkologicznych. CA-125 and HE 4 są szeroko stosowane w diagnostyce raka jajnika. CA-125 jest także markerem raka piersi (Jie Wu, Zhifeng Fu, Feng Yan, Huangxian Ju, *Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers*, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, No. 7, 2007, 679–688.). Innym markerem raka piersi jest CEA. Nowym markerem związanym z endometriozą jest aromataza (Gorodkiewicz E., Sankiewicz A., Laudański P. "Surface plasmon resonance imaging biosensors for aromatase based on a potent inhibitor and a specific antibody: Sensor development and application for biological material", Central European Journal of Chemistry, 2014, 12(5), 557–567.). Interleukina IL-6 jest znanym markerem stanów zapalnych. Równoczesne oznaczanie tych 5 biomarkerów dostarczy znacznie więcej informacji niż wynik pojedynczego biomarkera.

Techniką pozwalającą na oznaczanie tych biomarkerów jest powierzchniowy rezonans plazmonów w wersji obrazowej (Imaging) (SPRi) realizowany w wersji pęku punktów pomiarowych i pomiarem SPRi bez obecności roztworu a różniącą się technicznie od wersji przepływowej SPR. Została ona przedstawiona m.in. w pracach: A. Sankiewicz, L. Romanowicz, P. Laudański, 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. Sankiewicz, Z. Łukaszewski, K. Trojanowska, E. Gorodkiewicz, *Determination of collagen type IV by Surface Plasmon Resonance Imaging using a specific biosensor*, Anal Biochem. 2016; 515: 40–46; A. Sankiewicz, A. Markowska, Z. Łukaszewski, B. Puzan, E. Gorodkiewicz, *Methods for 20S Immunoproteasome and 20S Constitutive Proteasome Determination Based on SPRi Biosensors*, Cell Molec Bioengin. 2017; 10: 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. 2016;8:6428–6435; 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 Pharmac 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.

Zastosowanie bioanalityczne SPRi przedstawiają m.in. publikacje: A. Sankiewicz, T. Guszczy, R. Mena-Hortelano, K. Żukowski, E. Gorodkiewicz, *Podoplanin serum and urine concentration in transitional bladder cancer*, Cancer Biomark. 2016; 16: 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. 2016; 46: 407–411; A. Tokarzewicz, T. Guszczy, 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. 2018; 218: 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 chil-*

dren after thermal injury, Adv Med Sci. 2017; 62: 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, 2018; 44: 931–940; D. Toliczenko-Bematowicz, 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, 2018; 13 : 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. 2018; 42: 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. 2018; 31: 136–141; D. Toliczenko-Bematowicz, 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. 2018; 41: 1103–1106; E. Matuszczak, A. Sankiewicz, W. Debek, E. Gorodkiewicz, R. Milewski, A. 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. 2018; 191: 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. 2018; 27:1529–1534; R. Grzywa, E. Gorodkiewicz, E. Burchacka, A. Lesner, R. Laudański, Z. Łukaszewski, 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. 2014; 182: 38–42; P. Laudański, E. Gorodkiewicz, B. Ramotowska, R. Charkiewicz, M. Kuźmicki, 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. 2013;169: 80–83.

Technika ta pozwala na oznaczanie w płynach ustrojowych biomarkerów **CA-125** (Szymańska B., Łukaszewski Z., Hermanowicz-Szamatowicz K., Gorodkiewicz E., *A biosensor for determination of the circulating biomarker CA125/MUC16 by Surface Plasmon Resonance Imaging*, Talanta, 2020, 206, 120–187,) **CEA** (Szymańska B., Łukaszewski Z., Hermanowicz-Szamatowicz K., Gorodkiewicz E., *An immunosensor for the determination of carcinoembryonic antigen by Surface Plasmon Resonance imaging*, Analytical Biochemistry, 609(2020)113964), **aromatazy** (Guszcz T, Szymańska B., Kozłowski R., Łukaszewski Z., Laskowski R, Gorodkiewicz E., *Plasma aromatase as a sensitive and selective potential biomarker of bladder cancer and its role in tumorigenesis*, Oncology Letters, 2020, 19, 562–568.), **HE 4** (Szymańska B., Łukaszewski Z., Gorodkiewicz E., *An SPRI biosensor for determination of the ovarian cancer marker HE 4 in human plasma*, Sensors, w druku) oraz **IL-6** (Gorodkiewicz E., Szymańska B., Łukaszewski Z., Wyrwas B.” Biosensor do oznaczania interleukiny 6 (IL-6) techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging” za opisem patentowym P.433106.

Koncepcja panelu ginekologiczno-onkologicznego polega na umieszczeniu pięciu biosensorów na wspólnym chipie oraz wykorzystaniu szóstego miejsca pomiarowego dla pomiaru porównawczego – technicznie koniecznego w procesie pomiarowym.

Istotą wynalazku jest panel biosensorów ginekologiczno-onkologicznych do równoczesnego specyficznego oznaczania stężenia biomarkerów w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, służący do diagnostyki raka jajnika i innych schorzeń natury ginekologicznej.

Panel zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających pięć różnych warstw receptorowych z przeciwciałami specyficznymi do identyfikacji danego markera oraz jedną warstwę odniesienia. Warstwy receptorowe znajdują się na pięciu polach pomiarowych równomiernie rozłożonych na okręgu w panelu, a warstwa odniesienia stanowi szóste pole pomiarowe usytuowane w środku panelu.

Każde z sześciu pól pomiarowych zawiera dwanaście punktów pomiarowych. Nadto wszystkie przeciwciała są połączone kowalencyjnie z linkerem – cysteaminą łączącą receptory z warstwą złota pokrywającą płytkę szklaną, a warstwa odniesienia zawiera zimmobilizowane BSA.

Przy czym warstwy receptorowe pięciu pól pomiarowych równomiernie rozłożonych na okręgu stanowią: królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne wobec markera CA-125, królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne wobec markera HE 4, mysie monoklonalne przeciwciała specyficzne wobec

markera CEA, królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne wobec aromatazy oraz mysie monoklonalne przeciwciała specyficzne wobec interleukiny 6.

W korzystnym wariantcie dwanaście punktów pomiarowych, każdego z sześciu pól pomiarowych jest ułożone w układzie rzędowym 2-4-4-2.

Wynalazek w przykładzie realizacji przedstawiono, na rysunku na którym fig. 1 pokazuje architekturę panelu z warstwami receptorowymi z przeciwciałami specyficznymi do identyfikacji markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 i aromatazy; fig. 2 przedstawia wyniki oznaczania stężenia markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 i aromatazy w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika; fig. 3 wyniki oznaczania stężenia markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 i aromatazy w surowicy krwi zdrowych osób z grupy kontrolnej; a fig. 4. wyniki oznaczania stężenia markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 i aromatazy w surowicy krwi pacjentek z torbielą endometrialną.

Panel biosensorów do równoczesnego specyficznego oznaczania stężenia biomarkerów w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging w celu diagnostyki raka jajnika i innych schorzeń natury ginekologicznej zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających pięć różnych warstw receptorowych oraz jedną warstwę odniesienia. Architektura panelu składa się z pięciu pól pomiarowych (o kształcie okręgu) równomiernie rozłożonych na okręgu wokół szóstego pola pomiarowego usytuowanego w środku, a każde z sześciu pól pomiarowych zawiera dwanaście punktów pomiarowych – ułożonych w układzie rzędowym 2-4-4-2 (co pokazano na fig. 1).

Warstwę receptorową dla markera CA-125 stanowi królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne wobec markera CA-125, dla markera HE 4 – królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne wobec markera HE 4, dla markera CEA, mysie monoklonalne przeciwciała specyficzne wobec markera CEA, dla aromatazy ARO – królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne wobec aromatazy oraz dla interleukiny 6 – mysie monoklonalne przeciwciała i inhibitor specyficzny wobec interleukiny 6 IL-6, a wszystkie przeciwciała są połączone kowalencyjnie z linkerem – cysteaminą łączącą receptory z warstwą złota pokrywającą płytkę szklaną. Warstwa odniesienia zawiera zimmobilizowane BSA.

Warto dodać, że panel według wynalazku jest nowym narzędziem o dużym potencjale diagnostycznym, którego znaczenie oceni środowisko medyczne związane z diagnostyką raka jajnika i innych schorzeń natury ginekologicznej. Przykład realizacji stanowią próbki możliwości panelu. Jednocześnie podobne rozwiązania nie były dotychczas stosowane. Dodatkową korzyścią zastosowania panelu jest możliwość wyznaczenia algorytmu ROMA z otrzymanych wyników.

Przykłady stosowania

Cztery różne próbki surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika poddano oznaczaniu za pomocą panelu według przykładu realizacji. Wyniki oznaczania stężenia markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 i ARO w surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika przedstawiono na fig. 2.

Dla porównania przeprowadzono oznaczanie tych markerów w surowicy krwi czterech zdrowych osób z grupy kontrolnej. Wyniki oznaczania stężenia markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 i ARO w surowicy krwi zdrowych osób z grupy kontrolnej – przedstawiono na fig. 3.

Widać wyraźnie wielokrotnie wyższe wyniki w próbkach pacjentek z rakiem jajnika niż w grupie kontrolnej, a także zróżnicowanie wyników w grupie pacjentek, mogące świadczyć o różnym zaawansowaniu choroby.

Warto zwrócić uwagę, że wyniki CA-125 kształtują się na poziomie $\mu\text{g/ml}$, IL-6 – na poziomie pg/ml a pozostałych markerów – na poziomie ng/ml .

Zastosowanie panelu może także dotyczyć innych schorzeń natury ginekologicznej. Przykładem mogą być znacznie podwyższone wyniki markerów CA-125, HE 4, CEA, IL-6 i ARO w surowicy krwi pacjentek z torbielą endometrialną, co pokazano na fig. 4 rysunku.

Zastrzeżenia patentowe

1. Panel biosensorów do równoczesnego specyficznego oznaczania stężenia biomarkerów ginekologiczno-onkologicznych w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging w celu diagnostyki raka jajnika i innych schorzeń natury ginekologicznej **znamienny tym**, że zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających pięć różnych warstw receptorowych z przeciwciałami specyficznymi wobec danego markera oraz

jedną warstwę odniesienia, przy czym warstwy receptorowe znajdują się na pięciu polach pomiarowych równomiernie rozłożonych na okręgu a warstwa odniesienia stanowi szóste pole pomiarowe usytuowane w środku, przy czym każde z sześciu pól pomiarowych zawiera dwanaście punktów pomiarowych, nadto wszystkie przeciwciała są połączone kowalencyjnie z linkerem – cysteaminą łączącą receptory z warstwą złota pokrywającą płytkę szklaną, a warstwa odniesienia zawiera zimmobilizowane BSA (BSA), przy czym warstwy receptorowe pięciu pól pomiarowych równomiernie rozłożonych na okręgu stanowią: królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne wobec markera CA-125 (CA-125), królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne wobec markera HE 4 (HE4), mysie monoklonalne przeciwciała specyficzne wobec markera CEA (CEA), królicze poliklonalne przeciwciała specyficzne wobec aromatazy (ARO) oraz mysie monoklonalne przeciwciała specyficzne wobec interleukiny 6 (IL-6).

2. Panel biosensorów według zastrz. 1 **znamienny tym**, że dwanaście punktów pomiarowych, każdego z sześciu pól pomiarowych jest ułożone w układzie rzędownym 2-4-4-2.

Rysunki

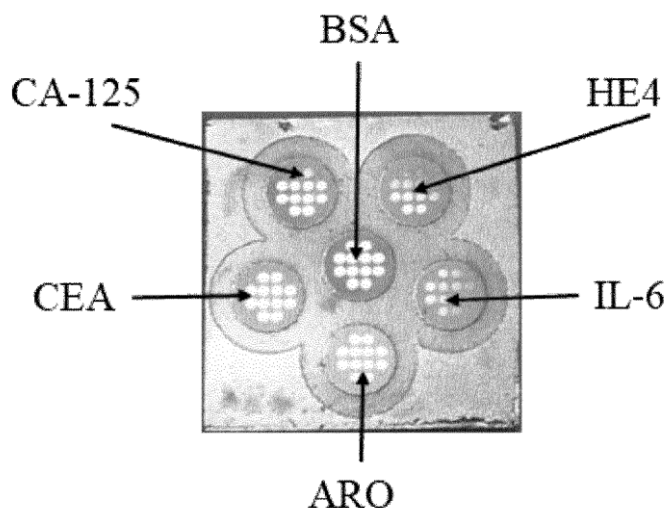


fig. 1

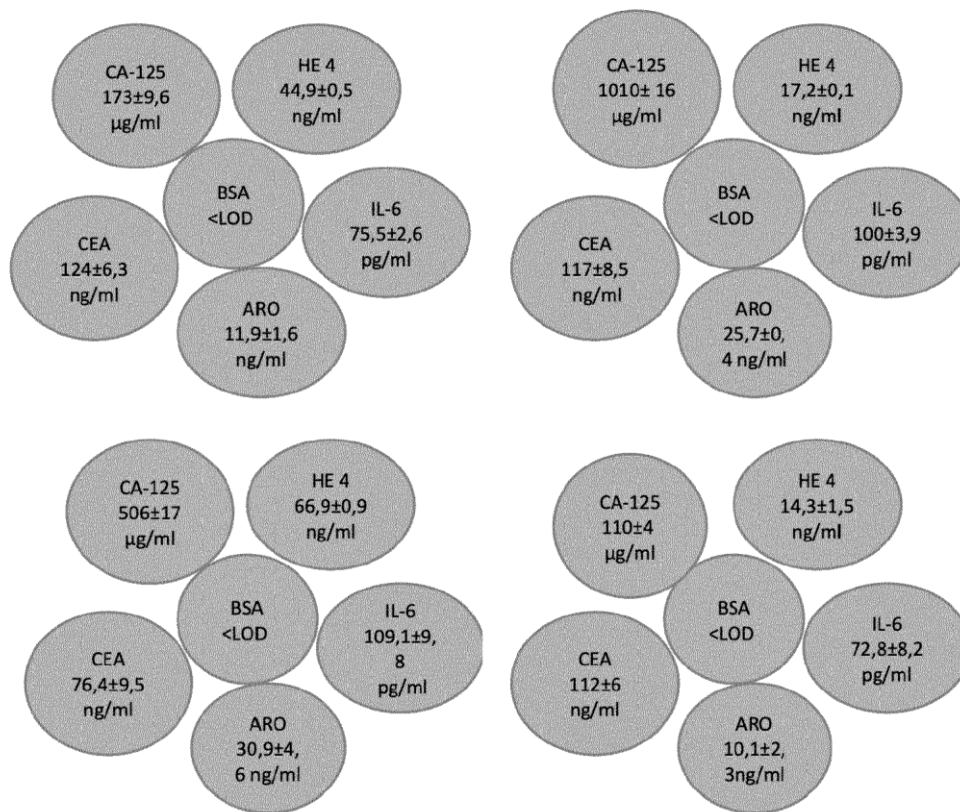


fig. 2

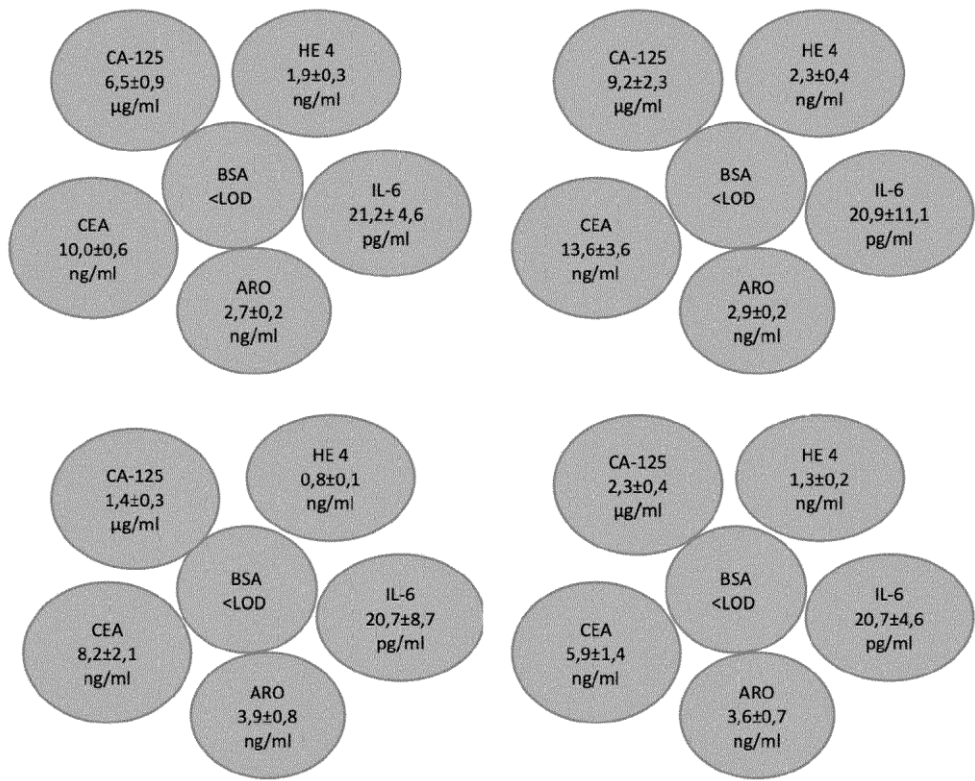


fig. 3

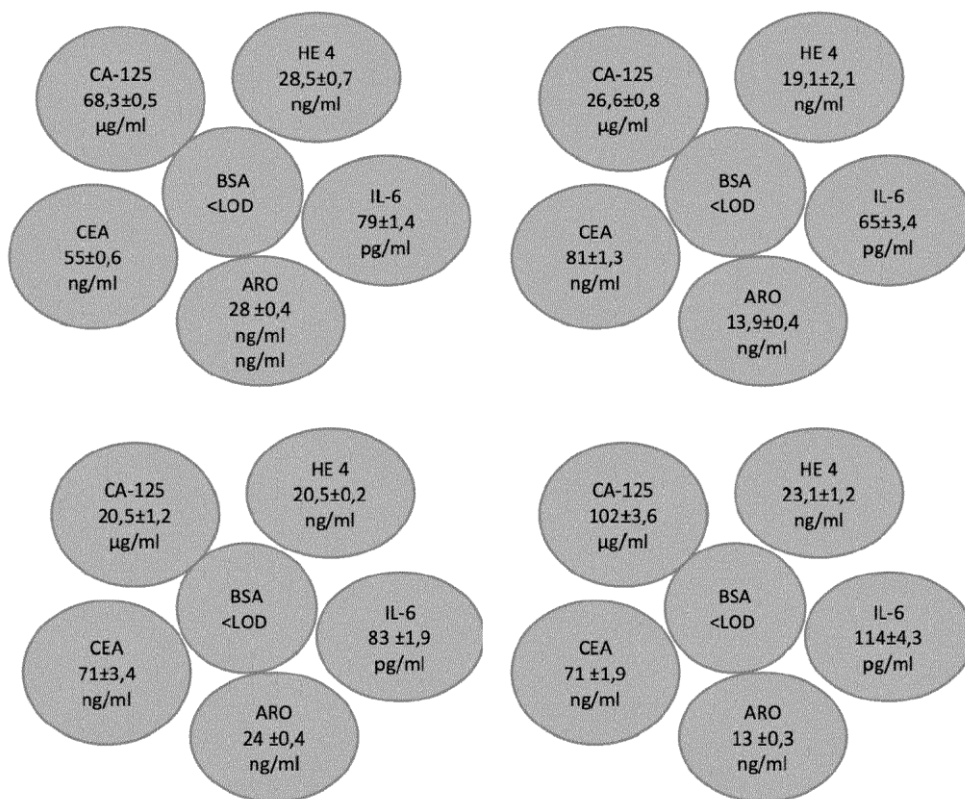


fig. 4