

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 441547 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **441547**(22) Data zgłoszenia: **2022.06.26**(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.12.27 BUP 52/2023**

(51) MKP:

G01N 33/543 (2006.01)**G01N 33/68** (2006.01)**G01N 21/55** (2014.01)

(71) Zgłaszający:

POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL
UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL

(72) Twórca(-y):

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

(74) Pełnomocnik:

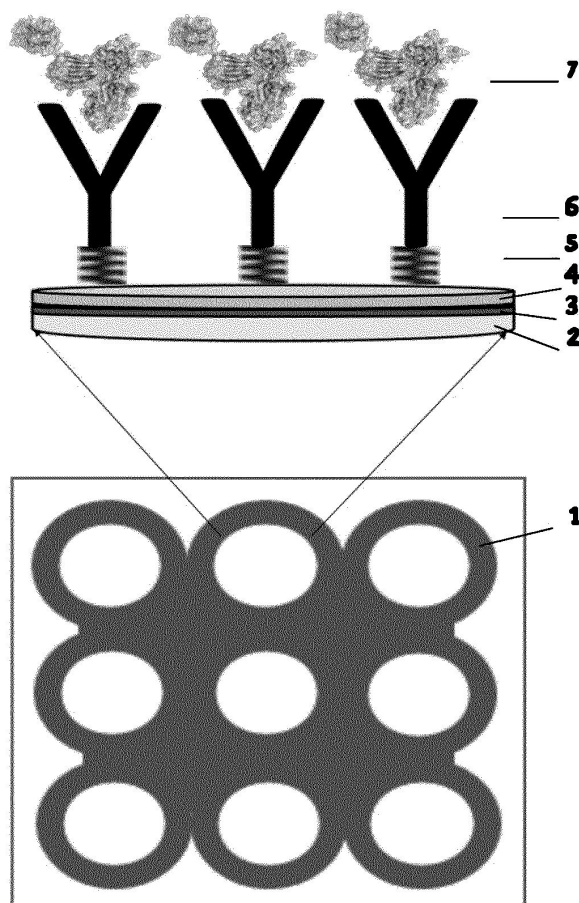
rzecz. pat. Marcin Walkowiak, Dobra, PL

(54) Tytuł:

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

(57) Skróć opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest biosensor do specyficznego oznaczania neuropiliny-1 w płynach ustrojowych i homogenatach tkan-kowych techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging. Składa się on 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 na neuropilinę-1 połączonego kowalencyjnie z linkerem - cysteaminą. Warstwa receptorowa specyficznie wychwytuje neuropilinę-1 (7) z badanego roztworu.



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

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 stężeń substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy: JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052, PL222548, PL222549, PL234488, PL 235043 ,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, J.; 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-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-10.3390/jcm11020412>

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/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., Lukaszewski Z., Recent Progress in Surface Plasmon Resonance Biosensors (2016 to Mid-2018), Biosensors, 2018, 4, 132,] [Falkowski P., Lukaszewski 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 przeciwciało specyficzne na neuropilinę-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 przeciwciało 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 na neuropilinę-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

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 przeciwciało specyficzne na neuropilinę -1 (6) połączone kowalencyjnie z linkerem, w postaci cysteaminy (5), łączącym receptor z warstwą tytanu (3) oraz złota (4) pokrywającą płytkę szklaną (2).

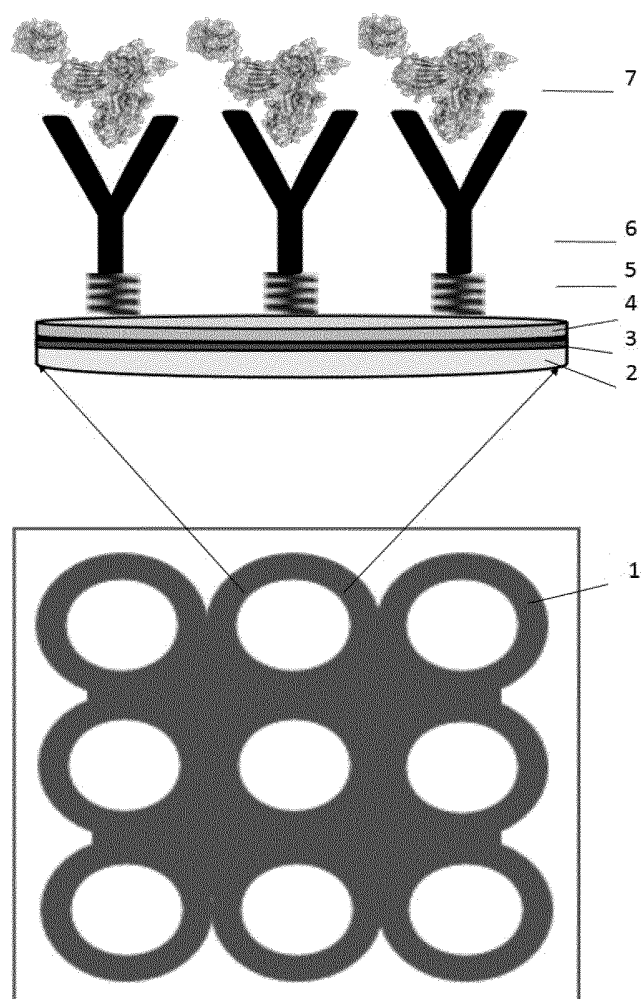


fig.1

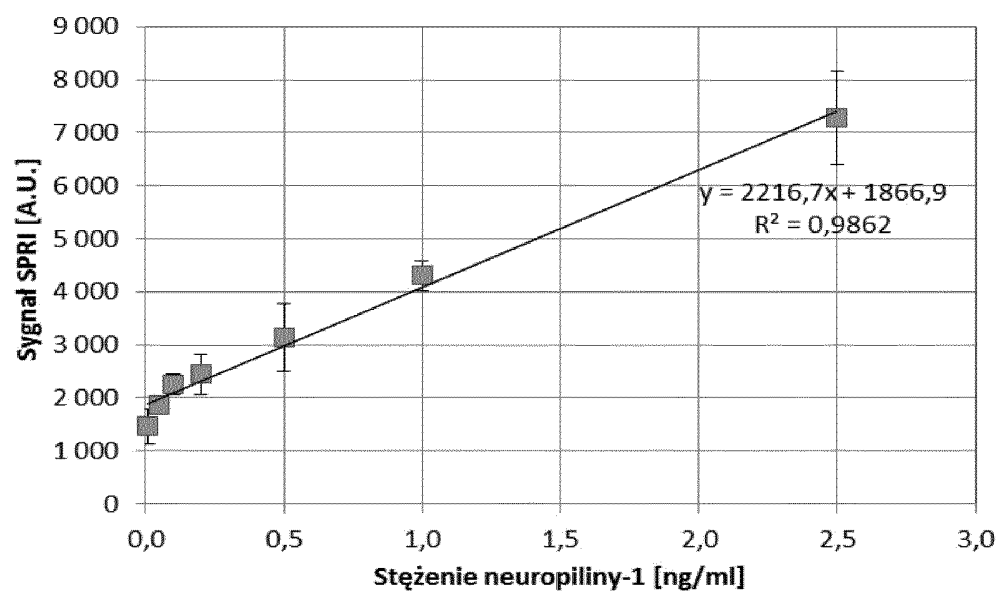
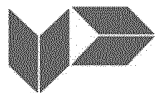


fig. 2



SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.441547

Klasyfikacja zgłoszenia: G01N 33/543, G01N 33/68, G01N 21/55		
Podklasy w których prowadzono poszukiwania: G01N		
Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: Epoquet (EPODOC, WPI, Embase, Medline), bazy UPRP, Internet (Google)		
Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	PL430495 A1 (Politechnika Poznańska) 11-01-2021 cały dokument	zastrz.
A	PL433106 A1 (Politechnika Poznańska et al.) 06-09-2021 cały dokument	zastrz.
A	PL432021 A1 (Politechnika Poznańska et al.) 31-05-2021 cały dokument	zastrz.
A	M. Teran et al.: "Characterization of receptor binding kinetics for vascular endothelial growth factor-A using SPR"; Anal Biochem.; 2019; 564-565: 21-31, cały dokument	zastrz.
☒ 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:

Małgorzata Kozłowska
Ekspert Koordynator

Data:

25.01.2023

Podpis:

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

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. z dnia 26.06.2022 r.

Kontynuacja wykazu dokumentów

Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	K. Pimková et al.: "Surface plasmon resonance biosensor for the detection of VEGFR-1- a protein marker of myelodysplastic syndromes"; Anal Bioanal Chem.; 2012; 402(1): 381-387 cały dokument	zastrz.