

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **234329**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422097**

(22) Data zgłoszenia: **03.07.2017**

(51) Int.Cl.

G01N 21/55 (2014.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(54)

Biosensor do oznaczania stężenia enzymu Katepsyny L

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

14.01.2019 BUP 02/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.02.2020 WUP 02/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny
w Białymstoku, Białystok, PL
Uniwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
ANNA TOKARZEWICZ, Białystok, PL
ADAM HERMANOWICZ, Białystok, PL**

PL 234329 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do oznaczania stężenia enzymu Katepsyny L (kat. L), zwłaszcza techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging (SPRI).

Katepsyna L (EC 3.4.22.15, endopeptydaza tiolowa) jest jedną z 11 ludzkich cysternowych proteaz (rodzina: peptydazy C1), która wykazuje podobieństwo katalityczne i sekwencyjne do niespecyficznej proteazy roślinnej – papainy. Wszystkie cysteinowe katepsyny wykazują maksymalną aktywność w lekko kwaśnym pH. Katepsyna L wykazuje maksimum aktywności (jest relatywnie trwała) w pH 4,4–5,5. Jest nietrwała w pH obojętnym (pH ~7,0). Enzym ten odgrywa główną rolę (wykazuje zdecydowanie wyższą aktywność niż katepsyna B czy katepsyna H) w lizosomalnej proteolizie zarówno komórkowych, jak i endocytozowanych makrocząsteczek. Hydrolizuje ciężkie i lekkie łańcuchy miozyny, aktynę, troponinę T, troponinę I, α -aktyninę, titinę, nebulinę. Enzym ten jest dimerem zbudowanym z łańcucha ciężkiego (175 aminokwasów) oraz łańcucha lekkiego (42 aminokwasy), które połączone są ze sobą mostkiem siarczkowym.

Katepsyna L jest pierwszą ludzką proteazą, która katalitycznie inaktywuje inhibitor proteinaz. Odgrywa ważną rolę w rozwoju oraz funkcjonowaniu ludzkiego endometrium i rozwoju zarodkowym. Ponieważ katepsyna L degradowała składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), uważa się, że enzym ten odgrywa kluczową rolę w rozwoju nowotworu, metastazie oraz innych schorzeniach, w których degradacja składników ECM jest głównym czynnikiem rozwoju choroby. Katepsyna L bierze aktywny udział w powstawaniu takich chorób jak: dystrofia mięśniowa, choroby przyzębia, resorpcja kości, reumatyzm. Wpływa na rozwój choroby nowotworowej oraz tworzenie przerzutów.

Wiele nowotworów takich jak nowotwór nerki, jąder, piersi, jajnika i okrężnicy wykazuje podwyższoną ilość katepsyny L, niż ma to miejsce w zdrowej tkance. Ekspresję katepsyny L w tkankach guza badano w raku pęcherza, ludzkiego glejaka, raka nosowej części gardła i stwierdzono, że jej podwyższony poziom wiąże się ze złym rokowaniem pacjenta. [Malinowska-Pańczyk E., et al., *Medycyna Wet.*, 2009: 65, 817–822; Mason R.W., et al., *Biochem. J.*, 1985: 226, 233–241; Nomura T., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1996: 228, 792–796; Hashida S., et al., *J. Biochem.*, 1980: 88, 1805–1811; Johnson D.A., et al., *J. Biol. Chem.*, 1986: 261, 14748–14751; Alfonzo S., et al., *Development*, 1997: 124, 3415–3425; Jokima V., et al., *Mol. Hum. Reprod.*, 2001: 7, 73–78; Weber E., et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1994: 120, 564–567; Mignatti P., et al., *Physiol. Rev.*, 1993: 73, 161–195; Trabandt A., et al., *Matrix*, 1990: 10, 349–361; Villadangos J.A., et al., *Immunol. Rev.*, 1999: 172, 109–120; Singh N., et al., *World J. Gastroenterol.*, 2014: 20, 17532–40; Sadana R., et al., *Indian J. Biochem. Biophys.*, 2003: 40, 315–23].

Do tej pory stężenie i aktywność enzymatyczną katepsyny L mierzono:

- fluorymetrycznie [Franta Z., et al., *Int. J. Parasitol.*, 2011: 41, 1253–126; Sadana R., et al., *Indian J. Biochem. Biophys.*, 2003: 40, 315–23; Ikeda Y., et al., *J. Med. Invest.*, 2000: 47, 61–75; Sivaparthi M., et al., *Clin. Exp. Metastasis*, 1996: 14, 27–34],
- immunohistologicznie [J. Liu et al., *Atherosclerosis*, 2006: 184, 302–11],
- testem immunoenzymatycznym (ELISA) [Liu Y., et al., *Am. J. Cardiol.*, 2009: 103: 476–81; J. Liu et al., *Atherosclerosis*, 2006: 184, 302–11; Singh N., et al., *World J. Gastroenterol.*, 2014: 20, 17532–40],
- kolorymetrycznie [Kamboj R.C., et al., *Biochimie.*, 1993: 75, 873–8],
- immunohistochemicznie [Singh N., et al., *World J. Gastroenterol.*, 2014: 20, 17532–40],
- techniką reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym [J. Liu et al., *Atherosclerosis*, 2006: 184, 302–11],
- techniką Western Blot [J. Liu et al., *Atherosclerosis*, 2006: 184, 302–11].

Technika rezonansu powierzchniowego plazmonów (ang. *Surface Plasmon Resonance Imaging*) jest niezwykle skutecznym narzędziem do oznaczania biologicznie aktywnych związków, została przedstawiona m.in. w pracach Lee H.J., et al., *J. Physiol.*, 2005: 563, 61–71; Lee H.J., et al., *Anal. Chem.*, 2006: 78, 6504–10; Fang S., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2006: 128, 14044–46; Gorodkiewicz E., *Protein Pept. Lett.*, 2009: 16, 1379–85; Gorodkiewicz E., et al., *Protein Pept. Lett.*, 2010: 17, 1148–54; Gorodkiewicz E., et al., *Microchim. Acta*, 2011: 175, 177–184; Gorodkiewicz E., et al., *Microchim. Acta*, 2012: 176, 337–43; Gorodkiewicz E., et al., *Cent. Eur. J. Chem.*, 2014: 12, 557–67; Sankiewicz A., et al., *Analyt. Biochem.*, 2015: 469, 4–11; Grzywa R., et al., *Eur. J. Ob. Gyn. Rep. Biol.*, 2014: 182, 38–42; Laudański P., et al., *Eur. J. Ob. Gyn. Rep. Biol.*, 2013: 169, 80–83.

Istotą wynalazku jest biosensor do oznaczania stężenia enzymu Katepsyny L (kat. L). Biosensor składa się ze szkiełka pokrytego warstwą: złota, chromu, warstwą funkcjonalizowanego tiolu, warstwą

czułą oraz siatką fotopolimerową nie zasłaniającą miejsc aktywnych, dzielącą biosensor na partycje. Warstwę czułą stanowi inhibitor Katepsyny L (Arg-Lys-Leu-Leu-Trp-NH₂, C₃₅H₅₉N₁₁O₅, masa cząsteczkowa: 713,91 g/mol). Dzięki zastosowaniu rozwiązania według wynalazku uzyskuje się bardzo szybką analizę badanego materiału, w tym: osocza, moczu, homogenatów tkanek na stężenie Katepsyny L.

Przedmiot wynalazku w przykładzie wykonania uwidoczniiony jest na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia przekrój pionowy przez biosensor, a fig. 2 przedstawia zakres prostoliniowy krzywej kalibracyjnej enzymu Katepsyny L.

Biosensor do oznaczania stężenia enzymu Katepsyny L (kat. L) składa się ze szkiełka (1) typu BK7, pokrytego warstwą złota (2) o grubości 50 nm, warstwą chromu (3), warstwą funkcjonalizowanego tiolu (4) – 1-oktadekanotiolu, warstwą czułą, którą stanowi inhibitor Katepsyny L (Arg-Lys-Leu-Leu-Trp-NH₂, C₃₅H₅₉N₁₁O₅, masa cząsteczkowa: 713,91 g/mol) (5) oraz siatką fotopolimerową (6) nie zasłaniającą miejsc aktywnych, dzielącą biosensor na partycje.

Biosensor działa współpracując z urządzeniem do pomiarów techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging (SPRI). Biosensor kładzie się na pryzmacie urządzenia. Odpowiednie przygotowanie biosensora polega na zimmobilizowaniu na warstwie złota (2) warstwy funkcjonalizowanego tiolu (4) – 1-oktadekanotiolu, a na niej tworzy się monowarstwę inhibitora Katepsyny L (Arg-Lys-Leu-Leu-Trp-NH₂, C₃₅H₅₉N₁₁O₅, masa cząsteczkowa: 713,91 g/mol) (5) w zakresie stężeń 1–100 ng/ml. Z plateau otrzymanej krzywej odczytuje się stężenie tego inhibitora, przy którym następuje maksymalne wysycenie powierzchni biosensora. Na poszczególne pola biosensora zawierające dużą liczbę miejsc aktywnych, np. 12, nakłada się wzorzec Katepsyny L tak, aby uzyskać stężenia 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0 ng/ml. Stężenia te odpowiadają prostoliniowemu odcinkowi krzywej kalibracyjnej Katepsyny L. Na wolne pola nakłada się próbki osocza pochodzących od zdrowych ludzi, jak i próbek osocza dzieci oparzonych.

Dwukrotnie rozcieńczone próbki osocza osób zdrowych i czterokrotnie rozcieńczone próbki surowicy krwi pobranej w trakcie zabiegu operacyjnego resekcji: guza jajnika, torbieli jajnika czy usunięcia pęcherzyka żółciowego nanoszone są na powierzchnię biosensora na 10 minut. Objętość przenieszonego roztworu wynosi ok. 3 µl. Powierzchnia biosensora jest przemywana co najmniej sześciokrotnie buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRI. Stężenie Katepsyny L odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

P r z y k ł a d

Oznaczenie stężenia Katepsyny L w próbkach osocza, pochodzących od osób zdrowych, jak i w surowicy krwi pobranej w trakcie zabiegu operacyjnego resekcji: guza jajnika, torbieli jajnika czy usunięcia pęcherzyka żółciowego. Z próbek osocza osób zdrowych otrzymano następujące wartości intensywności sygnału SPRI dla poszczególnych miejsc aktywnych:

1. 1931,49,
2. 2694,10,
3. 3261,97,
4. 2488,33,
5. 3244,27,
6. 2951,34,
7. 2312,91,
8. 2937,81,
9. 2464,49.

Odczytane z krzywej stężenia Katepsyny L wynoszą odpowiednio (ng/ml):

1. 2,53,
2. 5,59,
3. 7,87,
4. 4,77,
5. 7,80,
6. 6,62,
7. 4,06,
8. 6,57,
9. 4,67.

Po uwzględnieniu dwukrotnego rozcieńczenia otrzymano następujące wyniki stężenia:

1. 5,06,
2. 11,18,

3. 15,74,
4. 9,53,
5. 15,60,
6. 13,25,
7. 8,12,
8. 13,14,
9. 9,34.

Średnie stężenie wynosi 11,22 ng/ml.

Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ wynosi 2,32 ng/ml.

Średni wynik określono jako $11,22 \pm 2,32$ ng/ml.

Z próbek surowicy krwi pobranej w trakcie zabiegu operacyjnego resekcji: guza jajnika, torbieli jajnika czy usunięcia pęcherzyka żółciowego wartości intensywności sygnału SPRI dla poszczególnych miejsc aktywnych:

1. 2180,78,
2. 2160,96,
3. 3641,58,
4. 3321,58,
5. 2521,22,
6. 2969,70,
7. 3596,34,
8. 3362,58,
9. 2674,66.

Odczytane z krzywej stężenia Katepsyny L wynoszą odpowiednio:

1. 3,53,
2. 3,45,
3. 9,39,
4. 8,11,
5. 4,90,
6. 6,70,
7. 9,21,
8. 8,27,
9. 5,51.

Po uwzględnieniu czterokrotnego rozcieńczenia otrzymano następujące wyniki stężenia:

1. 14,13,
2. 13,81,
3. 37,57,
4. 32,44,
5. 19,59,
6. 26,79,
7. 36,85,
8. 33,09,
9. 22,05.

Średnie stężenie wynosi 26,26 ng/ml.

Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$ wynosi 7,97 ng/ml.

Średni wynik określono jako $26,26 \pm 7,97$ ng/ml.

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do oznaczania stężenia enzymu Katepsyny L składający się ze szkiełka (1), pokrytego warstwą złota (2), chromu (3), warstwą funkcjonalizowanego tiolu (4), warstwą czułą oraz siatką fotopolimerową (6) nie zasłaniającą miejsc aktywnych, **znamienny tym**, że warstwę czułą (5) stanowi inhibitor Katepsyny L Arg-Lys-Leu-Leu-Trp-NH₂.

Rysunki

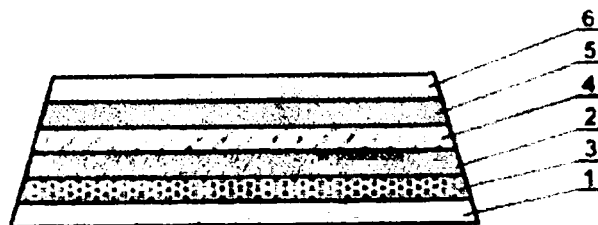


Fig. 1

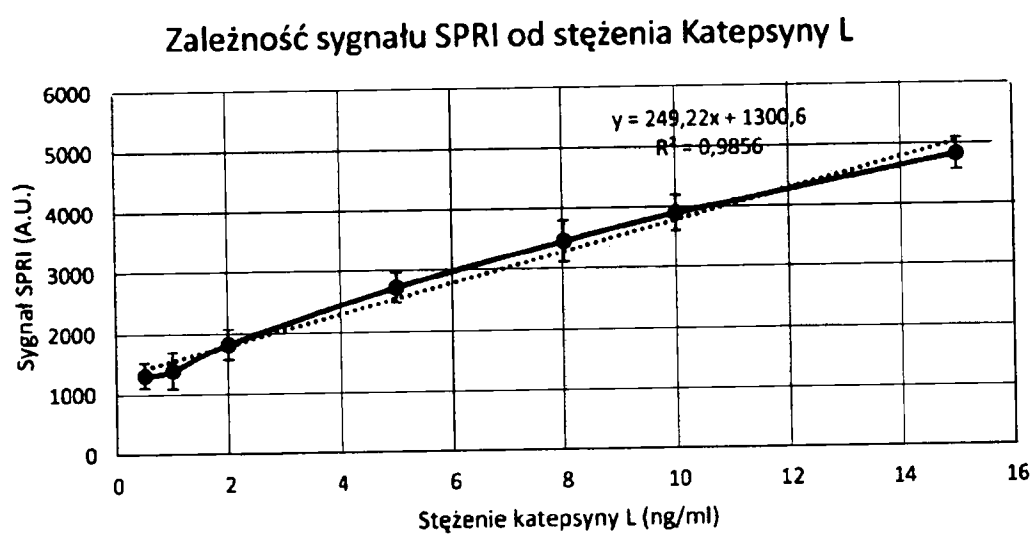


Fig. 2