

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **235043**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **412411**

(22) Data zgłoszenia: **21.05.2015**

(51) Int.Cl.

G01N 21/55 (2014.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(54) **Biosensor do oznaczania enzymu metaloproteinazy-1 z wykorzystaniem przeciwciała**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
05.12.2016 BUP 25/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
18.05.2020 WUP 05/20

(73) Uprawniony z patentu:
**UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:
**EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
ANNA TOKARZEWICZ, Białystok, PL**

PL 235043 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do oznaczania enzymu metaloproteinazy-1 (MMP-1).

Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. matrix metalloproteinases, MMPs) jest to grupa zależnych od cynku enzymów proteolitycznych, należących do endopeptydaz, których podstawową funkcją jest uczestniczenie w fizjologicznych i patologicznych procesach przebudowy i degradowania składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. extracellular matrix, ECM): kolagenu, lamininy, proteoglikanów, czy fibronektyny, co przekłada się na ułatwienie migracji komórek. Jednak ECM nie jest tylko biernym rusztowaniem tkanki, ale jest także rezerwuarem licznych czynników wzrostu, które uwolnione przez MMP mogą wpływać na komórki. Poza ECM substratami MMP są różnego rodzaju molekuły znajdujących się na powierzchni komórek. Mogą one uczestniczyć w procesie formułowania receptorów komórkowych oraz w procesach immunologicznych. Dlatego funkcji MMP nie można upraszczać tylko do prostej degradacji ECM. W swoim składzie zawierają atom cynku (Zn^{2+}), który pełni rolę katalityczną i strukturalną w cząsteczce enzymu.

MMP są syntetyzowane w postaci nieaktywnych zymogenów (proMMP). Aktywacja MMP odbywa się przez usunięcie prodomeiny, w wyniku czego następuje odsłonięcie miejsca aktywnego enzymu. MMP mogą być aktywowane przez inne proteazy lub czynnikami chemicznymi. Także niskie pH oraz podwyższona temperatura prowadzą do aktywacji MMP. Aktywność metaloproteaz jest precyzyjnie regulowana na poziomie transkrypcji, translacji oraz poprzez endogenne inhibitory, takie jak $\alpha 2$ -makroglobulina i tkankowe inhibitory metaloproteinaz (TIMP). Według obecnego stanu wiedzy rodzina macierzowych metaloproteinaz (MMP) to 21 enzymów podzielonych na podgrupy różniące się nieznacznie strukturą czwartorzędową oraz swoistością substratową (Śliwowska I., Kopczyński Z.: Metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej – charakterystyka biochemiczna i kliniczna wartość oznaczania u chorych na raka piersi; Współczesna Onkologia 2005; 9: 327–335; Starska K., Stasikowska O., Lukomski M., Lewy-Trenda I.: Correlation of membrane type I matrix metalloproteinase (MT1-MMP) expression with clinicomorphological features of tumor front in squamous cell carcinoma of the larynx; Polski merkuriusz lekarski, 2007; 135: 188–91; Hrabec E., Naduk J., Stręk M., Hrabec Z.: Kolagenazy typu IV (MMP-2 i MMP-9) i ich substraty – białka macierzy pozakomórkowej, hormony, cytokiny, hemokiny i ich receptory. Post. Biochem., 2007; 53: 37–45).

Metaloproteinaza-1 (MMP-1) zaliczana jest do kolagenoz. Degraduje kolagen typu I, II, III. Jej przydatność kliniczną wykazano w rozwoju, morfogenezie tkanek, gojeniu ran i innych procesach fizjologicznych (Durkan G. E., Nutt C. J., Rajjayabun P. H., Neal D. E., Lunec J.: Prognostic Significance of Matrix Metalloproteinase-1 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 in Voided Urine Samples from Patients with Transitional Cell Carcinoma of the Bladder; Clinical Cancer Research 2001; 7: 3450–3456).

Do tej pory stężenie i aktywności enzymatyczną MMP-1 mierzono:

- kanapkowym testem immunoenzymatycznym (ang. Sandwich ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay) (Maeda S., Sawai T.i, Uzuki M., Takahashi Y., Omoto H., Seki M., Sakurai M.: Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis; Annals of the Rheumatic Diseases 1995; 54: 970–975)
- metodami immunochemicznymi (Maeda S., Sawai T.i, Uzuki M., Takahashi Y., Omoto H., Seki M., Sakurai M.: Determination of interstitial collagenase (MMP-1) in patients with rheumatoid arthritis; Annals of the Rheumatic Diseases 1995; 54: 970–975)
- klasycznym testem immunoenzymatycznym (ELISA) (Myers A., Lakey R., Cawston T. E., Kay L. J., Walker D. J.: Serum MMP-1 and TIMP-1 levels are increased in patients with psoriatic arthritis and their siblings; Rheumatology 2004, 43: 272–276; Lehrke M., Greif M., Broed U.C., Lebherz C., Rüdiger Laubender P., Becker A., von Ziegler F., Tittus J., Reiser M., Becker Ch., Göke B., Steinbeck G., Leber A.W., Parhofer K. G.: MMP-1 serum levels predict coronary atherosclerosis in humans; Cardiovascular Diabetology 2009; 8: 50)
- testem fluorescencyjnym (Navratilova Z., Zatloukal J., Kriegova E., Kolek V., Petrek M.: Simultaneous up-regulation of matrix metalloproteinases 1, 2, 3, 7, 8, 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 4 in serum of patients with chronic obstructive pulmonary disease; Respirology 2012; 17: 1006–1012)
- spektrofotometrycznie [Evrosimovska B., Dimova C., Kovacevska L., Panov S.: Concentration Of Collagénases (Mmp-1, -8, -13) in Patients With Chronically Inflamed Dental Pulp Tissue; Sec. Biol. Med. Sci., 2012; XXXIII/2: 191–204)

- zymografią żelową (Imai K., Okada Y.: Assays for matrix metalloprotein activity; Protocol Exchange (2008), doi:10.1038/nprot.2008.85; Schütz A., Schneidenbach D., Aust G., Tannapfel A., Steinert M., Wittekind C.: Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinomas of the lung; Tumour Biol. 2002; 23: 179–84).
- immunohistologicznie [Schütz A., Schneidenbach D., Aust G., Tannapfel A., Steinert M., Wittekind C.: Differential expression and activity status of MMP-1, MMP-2 and MMP-9 in tumor and stromal cells of squamous cell carcinomas of the lung; Tumour Biol. 2002; 23: 179–84)
- techniką Western Blot- Recombinant Human MMP-1 Western Blot Standard test firmy R&D

Technika rezonansu powierzchniowego plazmonów (ang. Surface Plasmon Resonance Imaging) jest niezwykle skutecznym narzędziem do oznaczania biologicznie aktywnych związków, została przedstawiona m.in. Lee H.J., Yan Y., Marriott G., Corn R.M.: Quantitative functional analysis of protein complexes on surfaces; J Physiol 2005; 563: 61–71; 95 Lee H.J., Nedelkov D., Corn R.M.: Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements of Antibody Arrays for the Multiplexed Detection of Low Molecular Weight Protein Biomarkers; Anal Chem 2006; 78: 6504–6510; Fang S., Lee J., Wark A.W., Corn R.M.: Attomole Microarray Detection of MicroRNAs by Nanoparticle-Amplified SPR Imaging Measurements of Surface Polyadenylation Reactions. J Am Chem Soc 2006; 128: 14044–14046; Gorodkiewicz, E.: Surface Plasmon Resonance Imaging sensor for cathepsin determination based on immobilized cystatin. Protein Pept. Lett. 2009; 16: 1379–1385; Gorodkiewicz E., Regulska E.: SPR Imaging Biosensor for Aspartyl Cathepsins: Sensor Development and Application for Biological Material; Protein Pept Lett 2010; 17: 1148–1154; Gorodkiewicz E., Ostrowska H., Sankiewicz A.: SPR Imaging Biosensor for 20S proteasome: Sensor Development and Application for Measurement of Proteasomes in Human Blood Plasma; Microchim. Acta 2011; 175: 177–184; Gorodkiewicz E., Charkiewicz R., Rakowska A., Bajko P., Chyczewski L., Niklinski J.: SPR Imaging Biosensor for Podoplanin: Sensor Development and Application for Biological Material; Microchim. Acta 2012; 176: 337–343; 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: 557–567, Sankiewicz A., Laudanski P., Romanowicz L., Hermanowicz A.: Development of surface resonance imaging biosensors for detection of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1; Analytical Biochemistry 2015; 469: 4–11, Grzywa R., Gorodkiewicz E., Burchacka E., Lesner A., Laudański P., Łukaszewski Z., Sieńczyk M.: Determination of cathepsin G in endometrial tissue using a surface plasmon resonance imaging biosensor with tailored phosphonic inhibitor; European Journal of Obstetrics et Gynecology and Reproductive Biology 2014; 182: 38–42, Laudański P., Gorodkiewicz E., Ramotowska B., Charkiewicz R., Kuźmicki M., Szamatowicz J.: Determination of cathepsins B, D and G concentration in eutopic proliferative endometrium of women with endometriosis by surface plasmon resonance imaging (SPRI) technique; European Journal of Obstetrics et Gynecology and Reproductive Biology 2013; 169: 80–83.

Istotą wynalazku jest biosensor umożliwiający specyficzne oznaczanie metaloproteinazy-1 techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging. Biosensor składa się ze szkiełka, korzystnie typu BK7 oraz czterech warstw, na które nałożona jest siatka polimeru dzieląca sensor na partycje. Spodnią warstwę biosensora stanowi chrom, na który nałożone jest złoto, korzystnie o grubości 50 nm, a następnie tiolowy linker, korzystnie cysteamina. Warstwę wierzchnią biosensora stanowi królicze, specyficzne, zimmobilizowane przeciwciało przeciwko ludzkiej metaloproteinazie-1.

Dzięki zastosowaniu rozwiązania według wynalazku uzyskuje się bardzo szybką analizę badanego materiału, w tym: osocza, moczu, śliny, homogenatów tkanek na stężenie metaloproteinazy-1.

Przedmiot wynalazku uwidoczniiony jest na rysunku, na którym Fig. 1 przedstawia przekrój pionowy przez biosensor, a Fig. 2 przedstawia zakres prostoliniowy krzywej kalibracyjnej enzymu MMP-1. Biosensor składa się ze szkiełka (1) oraz czterech warstw. Spodnią warstwę biosensora stanowi chrom (3), na który nałożone jest złoto (2) korzystnie o grubości 50 nm, następnie tiolowy linker (4) oraz królicze, specyficzne, zimmobilizowane przeciwciało przeciwko ludzkiej metaloproteinazie-1 (5). Sensor na partycje dzieli siatka polimeru (6).

Sensor działa współpracując z urządzeniem do pomiarów techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji *Imaging* (SPRI). Sensor kładzie się na pryzmacie urządzenia. Odpowiednie przygotowanie sensora polega na zimmobilizowaniu na warstwie złota (2), monowarstwy tiolu (4) np. cysteaminy, a na niej utworzenie monowarstwy króliczego, specyficznego przeciwciała przeciwko ludzkiej MMP-1 (5) w zakresie stężeń 50- 300 ng/ml- z plateau otrzymanej krzywej odczytuje się stężenie tego

przeciwiała przy którym następuje maksymalne wysycenie powierzchni biosensora. Na poszczególne pola sensora zawierające dużą liczbę miejsc aktywnych np. 12, nakłada się wzorzec MMP-1 tak, aby uzyskać stężenia 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 ng/ml. Stężenia te odpowiadają prostoliniowemu odcinkowi krzywej kalibracyjnej MMP-1. Na wolne pola nakłada się próbki osocza i moczu pochodzących od zdrowych ludzi jak i pacjentów z nowotworem pęcherza.

Nierozcieńczane próbki moczu od osób zdrowych i pięciokrotnie rozcieńczone próbki pochodzące od pacjentów z nowotworem pęcherza, nanoszone są na powierzchnię sensora na 10 minut. Objętość przenieszonego roztworu wynosi ok. 3 μ l. Powierzchnia sensora jest przemywana co najmniej sześciokrotnie buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRI. Stężenie MMP-1 odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

Przykład

Oznaczenie stężenia MMP-1 w próbkach osocza i moczu pochodzące od pacjentów z nowotworem pęcherza i od osób zdrowych.

Z próbek moczu od pacjentów z nowotworem pęcherza otrzymano następujące wartości intensywności sygnału SPRI dla poszczególnych miejsc aktywnych:

1. 3831,006
2. 4186,15
3. 4789,01
4. 3901,65
5. 4207,25
6. 4004,74
7. 2782,47
8. 3580,70

Odczytane z krzywej stężenia MMP-1 wynoszą odpowiednio:

1. 0,90
2. 0,80
3. 1,03
4. 1,26
5. 0,92
6. 0,96
7. 1,04
8. 0,49
9. 0,80

Po uwzględnieniu pięciokrotnego rozcieńczenia otrzymano następujące wyniki stężenia:

1. 4,48
2. 4,01
3. 5,16
4. 6,32
5. 4,62
6. 4,81
7. 2,47
8. 4,00

Średnie stężenie wynosi 4,56 ng/ml.

Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ wynosi 0,10 ng/ml

Średni wynik określono jako $4,56 \pm 0,10$ ng/ml.

Z próbek moczu od zdrowych osób otrzymano następujące wartości intensywności sygnału SPRI dla poszczególnych miejsc aktywnych:

1. 2128,90
2. 2372,09
3. 2032,15
4. 3336,58
5. 3130,91

6. 2688,99
7. 2323,72
8. 2866,76
9. 2213,65

Odczytane z krzywej stężenia MMP-1 wynoszą odpowiednio:

1. 0,24
2. 0,34
3. 0,20
4. 0,71
5. 0,63
6. 0,46
7. 0,32
8. 0,53
9. 0,27

Średnie stężenie wynosi 0,41 ng/ml.

Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ wynosi 0,01 ng/ml.

Średni wynik określono jako $0,41 \pm 0,01$ ng/ml.

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do oznaczania enzymu metaloproteinazy-1 (MMP-1) składający się ze szkiełka (1) oraz czterech warstw, na które nałożona jest siatka polimeru (6) dzieląca sensor na partycje, przy czym spodnią warstwę biosensora stanowi chrom (3), na który nałożone jest złoto (2) korzystnie o grubości 50 nm, następnie tiolowy linker (4), a biosensor jest **znamienny tym**, że jego warstwę wierzchnią stanowi królicze, specyficzne, zimmobilizowane przeciwciało przeciwko ludzkiej metaloproteinazie-1 (5).

Rysunki

