RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **236773**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428062**

(22) Data zgłoszenia: **04.12.2018**

(51) Int.Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 21/55 (2014.01)

(54) **Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia białka CA125**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
15.06.2020 BUP 13/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.02.2021 WUP 04/21

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
BOGDAN WYRWAS, Poznań, PL
EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
BEATA SZYMAŃSKA, Krasne Małe, PL
ZENON ŁUKASZEWSKI, Kamionki, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Marcin Walkowiak

PL 236773 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania stężenia białka CA125 w płynach ustrojowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging.

Antygen CA125 jest glikoproteiną o wysokiej masie cząsteczkowej składającą się z około 22 000 aminokwasów (220 kDa). Jest również znany jako mucyna 16 (MUC16). Aktywność CA 125 jest podwyższona u 90% pacjentów z nabłonkowym rakiem jajnika.[Lamberti L, Scarano S., Esposito C. L., Antoccia A., Antonini G., Tanzarella C., De Franciscis V., M. Minunni, *„In vitro selection of RNA aptamers against CA125 tumor marker in ovarian cancer and its study by optical biosensing",* Methods 2016, 97, 58–68.]

Obecnie CA125 oznaczane w surowicy jest najczęściej stosowanym markerem nowotworowym nabłonkowego raka jajnika. Stwierdzono także, że stężenie białka CA125 jest podwyższone w kilku łagodnych chorobach jajników, takich jak endometrioza jajników, cystadenoma jajnika i dojrzały teratoma [Buamah P., *„Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration.",* Journal of Surgical Oncology, 2000, 75, 264–265.]

Prawidłowe komórki jajowe nie wykazują ekspresji CA 125 [Moss EL , Moran A., Reynolds TM:, Stokes-Lampard H., *„Views of general practitioners on the role of CA125 in primary care to diagnose ovarian cancer".,* BMC Women's Health, 2013, 13, 8], Wartość odcięcia (cut off) dla tego markera wynosi 35 U/ml. Zwiększona maksymalna wartość do 300 U/ml występuje podczas menstruacji i w pierwszym trymestrze ciąży, w zapaleniu wątroby, trzustki i przydatków, w marskości wątroby i w chorobach autoimmunologicznych. Po okresie menopauzy zmniejsza się stężenie markera CA125. Czułość diagnostyczna tego antygenu jest dość wysoka w przypadku surowiczego, endometrialnego i jasnokomórkowego raka jajnika. Podwyższony poziom białka CA125 obserwuje się również u niektórych pacjentów z gruczołakorakiem płuca, piersi, śluzówki macicy i trzustki. Bardzo często oznaczanie opisanego antygenu stosuje się w kontroli po chirurgicznym leczeniu raka jajnika. [Moss EL, Hollingworth J, Holland M, Murphy DJ, Fernando I, Reynolds T.M., *„The use and understanding of CA125 as a tumor marker for ovarian cancer: a questionnaire-based survey*.", International Journal of Gynecological Cancer, 2008, 18, 439–445.]

Białko CA125 jest oznaczany pojedynczo jak również oznacza się go w połączeniu z markerem HE4 w algorytmie, który również wpływa na stan menopauzy: algorytm ten nazwano ROMA (Risk of Alcoholithritis Algorithm).

Wartość ROMA jest obliczana za pomocą następującego równania [Macuks R., Baidekalna I., Donina S. *„An ovarian cancer malignancy risk index composed of HE4, CA125, ultrasonographic score, and menopausal status: use in differentiation of ovarian cancers and benign lesions"* Tumour Biology, *2012,33, 1811–7.]:*

ROMA(%)=exp(PI)/[1+exp(PI)]x100

gdzie:

przedmenopauzalny PI=(-12) + 2,38 ln(HE4) + 0,0626 ln(CA125)

po menopauzie PI = (- 8.09) + 1.04 ln (HE4) + 0.732 ln (CA125)

Alternatywną możliwością oznaczanie białka CA125 jest zastosowanie biosensora współpracującego z techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging (SPRI) – [*Surface Plasmon Resonance Imaging*].

Technika ta jest niezwykle skutecznym narzędziem do oznaczania biologicznie aktywnych związków. Została ona przedstawiona m.in. w pracach Lee H.J., et al., J. Physiol., 2005: 563, 61–71; Gorodkiewicz E., et al., Protein Pept. Let., 2010: 17, 1148–54; Gorodkiewicz E., et al., Microchim. Acta, 2011: 175, 177–184; Grzywa R., et al., Eur. J. Ob. Gyn. Rep. Biol., 2014:182, 38–42.

Rozwój techniki SPRI daje szansę zrewolucjonizowania pomiarów stężenia związków biologicznie aktywnych istotnych diagnostycznie. Warunkiem takiego upowszechnienia jest konstrukcja specyficznych biosensorów dostosowanych do pomiarów SPRI. Przy obecnym stanie wiedzy znane są różnego rodzaju biosensory wykorzystywane do oznaczania stężeń związków biologicznie aktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy wynalazków JP2009133844 (A),US6239255, PL223400, PL210052 czy też PL222548.

Opisywany wynalazek mieści się w tym nurcie rozwiązań. Kluczową cechą omawianych biosensorów jest prostota ich konstrukcji stanowiąca przewagę, także ekonomiczną, w odniesieniu do kilkustopniowych pośrednich rozwiązań stosowanych w innych metodach.

Różnice w sygnale analitycznym przy użyciu techniki SPRI są uzależnione od przyrostu masy na powierzchni biosensora. Dobór odpowiedniego receptora-antyciała zapewnia utrzymanie zakresu pomiarowego odpowiedniego do oznaczania CA125 w surowicy lub osoczu krwi ludzkiej.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania stężenia stężenia białka CA125 w płynach ustrojowych (osocze krwi, mocz) i homogenatach tkankowych dostosowany do współpracy z techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging (SPRI). Biosensor według wynalazku zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową.

Warstwę receptorową stanowi królicze poliklonalne przeciwciało specyficzne wobec białka CA-125 połączone kowalencyjnie z linkerem, w postaci cysteaminy. Linker łączy receptor z warstwą złota pokrywającą płytkę szklaną. Marker CA125 jest specyficznie wyłapywany z próbki.

Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia stężenia białka CA125 w płynach ustrojowych w przykładzie realizacji został przedstawiony na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat biosensora, a fig. 2 pokazuje krzywą białka CA-125 – zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia białka CA-125.

Biosensor składa się z płytki szklanej 1 pokrytej warstwą złota 2 oraz siatka polimeru 3 tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową (widok A fig. 1). Warstwa receptorowa składa się z linkera – cysteaminy 4 oraz króliczego poliklonalnego przeciwciała 5 specyficznego CA-125 połączonego kowalencyjnie z linkerem (widok B fig. 1). Warstwa wobec białka receptorowa specyficznie wyłapuje Marker CA125 (6) z badanego roztworu (widok C).

Charakterystyczną cechą biosensora jest jego specyficzne wiązanie się tylko z białkiem CA125 w obecności wszystkich innych substancji wchodzących w skład płynów ustrojowych lub homogenatów tkanek. Wraz z połączeniem z techniką SPRI opracowany biosensor zapewnia specyficzność w warunkach oznaczania CA125 w takich matrycach jak osocze krwi, ponadto, przez dobór odpowiedniego przeciwciała, zakres pomiarowy jest dostosowany do oznaczania CA125 w płynach ustrojowych; w tym zakresie sygnał liniowo zmienia się w zależności od stężenia CA125. Sensor zapewnia pomiary z dobrą precyzją i odzyskiem. Istotne jest to, że opracowany biosensor oznacza stężenie CA125, w odróżnieniu od aktywności enzymatycznej mierzonej techniką ELISA.

Przykładem działania biosensora jest oznaczanie białka CA125 w surowicy pacjentek cierpiących na raka jajnika.

Biosensor według wynalazku został wykorzystany do oznaczania stężenia białka CA125 w surowicy krwi pacjentek cierpiących na raka jajnika. Próbka surowicy jest rozcieńczana buforem PBS 2-krotnie. Na aktywne miejsca biosensora są nanoszone rozcieńczone próbki surowicy. Objętość próbki wynosi około 3 μl. Po upływie 10 min powierzchnia biosensora jest przemywana sześciokrotnie wodą. Mierzy się sygnał SPRI. Stężenie CA125 odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

Z próbki surowicy otrzymano następujące wartości intensywności sygnału SPRI dla poszczególnych miejsc aktywnych:

1. 5282
2. 5117
3. 5234
4. 5097
5. 4866
6. 5468
7. 5635
8. 5193
9. 5593
10. 5342
11. 5352
12. 4799

Odczytane z krzywej stężenia CA125 wynoszą odpowiednio (po uwzględnieniu rozcieńczenia):

1. 38,48 μg/ml
2. 35,60
3. 37,66
4. 35,25
5. 31,76

6. 41,72
7. 44,64
8. 36,93
9. 43,10
10. 39,52
11. 40,03
12. 30,17

Średnie stężenie wynosi 37,90 μg/ml.
Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności α=0,05 wynosi 2,20.
Średni wynik określono (37,90±2,20) μg/ml.

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia białka CA125 w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową **znamienny tym**, że warstwę receptorową stanowi królicze poliklonalne przeciwciało (5) specyficzne wobec białka CA-125 połączone kowalencyjnie z linkerem (4), w postaci cysteaminy, łączącym receptor z warstwą złota (2) pokrywającą płytkę szklaną (1).

Rysunki

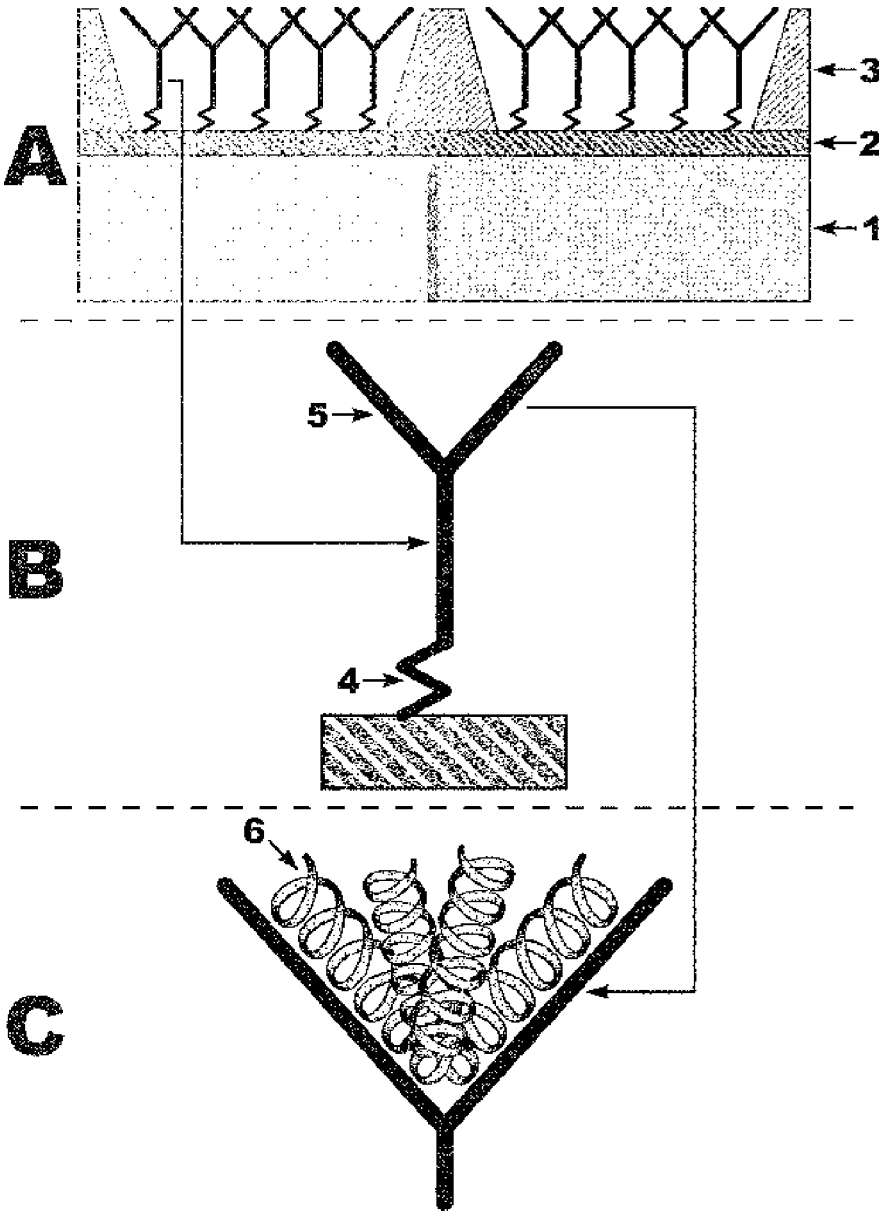

fig.1

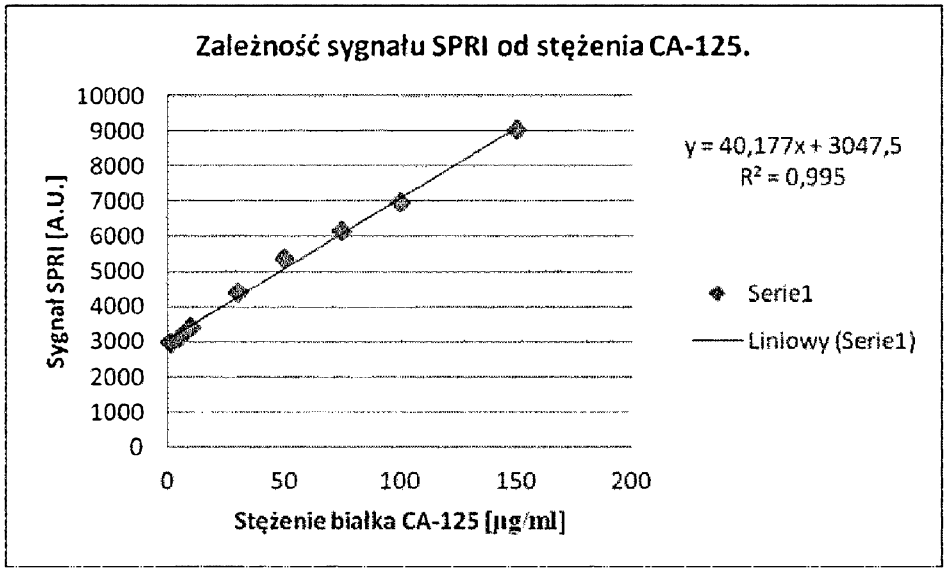
Zależność sygnału SPRI od stężenia CA-125.
Sygnał SPRI [A.U.]
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
50
100
150
200
Stężenie białka CA-125 [µg/ml]
y = 40,177x + 3047,5
R² = 0,995
Serie1
Liniowy (Serie1)

fig. 2