

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **241405**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **433106**

(22) Data zgłoszenia: **02.03.2020**

(51) Int.Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

(54) **Biosensor do oznaczania interleukiny 6 (IL-6) techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

06.09.2021 BUP 23/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

26.09.2022 WUP 39/22

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

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

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Walkowiak

PL 241405 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania interleukiny 6 (IL-6) w płynach ustrojowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging z zastosowaniem przeciwciała w warstwie receptorowej.

Główną rolą IL-6 w organizmie jest inicjowanie i regulacja ostrej reakcji zapalnej (Rincon M. "Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases Mercedes Rincon." Trends in Immunology, 2012, 33, 571–577.). Z tego powodu IL-6 jest perspektywnym markerem sepsy (Dezhi Huang, Haojun Ying, Dongneng Jiang, Fei Liu, Ye Tian, Chunlan Du, Liqun Zhang, Xiaoyun Pu, *Rapid and sensitive detection of interleukin-6 in serum via time-resolved lateral flow immunoassay*, Analytical Biochemistry, 588(2020)113468).

Poziom markera w krwi jest także znacząco podwyższony w przypadku szeregu nowotworów takich jak rak jelita grubego (Claudio Belluco, MD, PhD, Donato Nitti, MD, Marilyn Frantz, BS, Paola Toppan, MD, Daniela Basso, MD, Mario Plebani, MD, Mario Lise, MD, and J. Milburn Jessup, MD, *Interleukin-6 Blood Level Is Associated With Circulating Carcinoembryonic Antigen and Prognosis in Patients With Colorectal Cancer*, Annals of Surgical Oncology, 7(1): 133–138) czy raka wątrobowokomórkowego (Juliane Lokau, Victor Schoeder, Johannes Haybaeck, Christoph Garbers, Jak-Stat *Signaling Induced by Interleukin-6 Family Cytokines in Hepatocellular Carcinoma*, Cancers 2019, 11, 1704; doi: 10.3390/cancers 11111704.).

Ludzka interleukina 6 jest stosunkowo małą glikoproteiną zbudowaną z 184 aminokwasów o masie cząsteczkowej 26kDa (Rincon M. "Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases Mercedes Rincon." Trends in Immunology, 2012, 33, 571–577.).

Stężenie IL-6 w osoczu krwi zdrowych dorosłych ludzi znajduje się na bardzo niskim poziomie poniżej 10 pg/ml.

IL-6 jest oznaczana w płynach ustrojowych za pomocą kilku metod:

- testu ELISA [Timmons BW1, Hamadeh MJ, Tarnopolsky MA. *Two methods for determining plasma IL-6 in humans at rest and following exercise*. Eur J Appl Physiol. 2009; 105(1):13–8],
- testu immunochemiluminiscencyjnego (L. Luo, Z. Zhang, L. Hou, J. Wang, W. Tian, *The study of a chemiluminescence immunoassay using the peroxyoxalate chemiluminescent reaction and its application*, Talanta 72 (2007) 1293–1297.)
- elektrochemicznego sensora. (T. Li, M. Yang, *Electrochemical sensor utilizing ferrocene loaded porous polyelectrolyte nanoparticles as label for the detection of protein biomarker IL-6*, Sens. Actuators B Chem. 158 (2011)361–365)
- lub elektrochemicznych immunosensorów różnych konstrukcji (Y. Lou, T. He, F. Jiang, J.-J. Shi, J.-J. Zhu, *A competitive electrochemical immunosensor for the detection of human interleukin-6 based on the electrically heated carbon electrode and silver nanoparticles functionalized labels*, Talanta 122 (2014) 135–139; I. Ojeda, M. Moreno-Guzmán, A. González-Cortés, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, *Electrochemical magnetoimmunosensor for the ultrasensitive determination of interleukin-6 in saliva and urine using poly-HRP streptavidin conjugates as labels for signal amplification*, Anal. Bioanal. Chem. 406 (2014) 6363–6371; G.-C. Fan, X.-L. Ren, C. Zhu, J.-R. Zhang, J.-J. Zhu, *A new signal amplification strategy of photoelectrochemical immunoassay for highly sensitive interleukin-6 detection based on TiO₂/CdS/CdSe dual co-sensitized structure*, Biosens. Bioelectron. 59 (2014)–53; M. Tertiş, B. Ciui, M. Suci, R. Săndulescu, C. Cristea, *Label-free electrochemical aptasensor based on gold and polypyrrole nanoparticles for interleukin 6 detection*, Electrochim. Acta 258 (2017) 1208–1218.)

Alternatywną możliwością oznaczania interleukiny 6 jest zastosowanie biosensora i techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging) (SPRi).

Technika powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging) (SPRi) została przedstawiona m.in. w pracach: A. Sankiewicz, L. Romanowicz, P. Laudanski, 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. Lukaszewski, 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. Lukaszewski, 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. 8 (2016) 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. Zukowski, E. Gorodkiewicz E, *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 children 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-Bernatowicz, 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-Bernatowicz, 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, P. Laudanski, Z. Lukaszewski, 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. Laudanski, E. Gorodkiewicz, B. Ramotowska, R. Charkiewicz, M. Kuzmicki, 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.

Biosensor wychwytuje wyłącznie oznaczaną substancję z roztworu, a apartura SPRi reaguje na przyrost masy na powierzchni biosensora i przekształca go w sygnał analityczny. Rozwiązanie takie charakteryzuje prostota zarówno wykonania biosensora, jak i przeprowadzenia procesu pomiarowego. Dlatego rozwiązanie to może konkurować z obecnie stosowanymi metodami oznaczania substancji biologicznie aktywnych. Według obecnego stanu techniki istnieją liczne biosensory SPRi umożliwiające oznaczania stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy: JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052, PL222548, PL417435 czy też PL422096.

Obecny stan techniki obejmuje także biosensor do oznaczania IL-6 w oparciu o klasyczną technikę SPR (Tzu-Hsiang Chou, Chun-Yu Chuang, Chien-Ming Wu, *Quantification of Interleukin-6 in cell culture medium using surface plasmon resonance biosensors*, Cytokine 51 (2010) 107–111).

Biosensor ten stosuje przeciwciało specyficznie oddziaływujące z IL-6 jako receptor zimmobilizowany na powierzchni biosensora za pomocą linkera kwasu merkaptoundecyloвого a także drugie bio-

tyniowane przeciwciała specyficznie oddziaływujące z IL-6 w celu wytworzenia agregatu typu sandwich. Operacja ta ma na celu wzmocnienie sygnału analitycznego. Pomimo tego zabiegu biosensor współpracujący z techniką SPR zdecydowanie nie osiąga parametrów analitycznych koniecznych do oznaczania IL-6 w krwi. Wymagana granica wykrywania (LOD) jest 1000-krotnie niższa.

Istotą zgłaszanego wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania IL-6 w płynach ustrojowych (osocze lub surowica krwi, mocz) lub homogenatach tkankowych dostosowany do współpracy z techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging). Opracowany biosensor wykorzystuje mysie monoklonalne przeciwciała specyficzne wobec IL-6 jako receptor oraz cysteaminę jako linker i spełnia warunki analityczne pod względem zakresu pomiarowego, specyficzności, precyzji i dokładności pomiaru. Zakres pomiarowy biosensora obejmuje zakres stężeń IL-6 w krwi zarówno zdrowych osób jak i pacjentów cierpiących na choroby nowotworowe lub sepsę. Biosensor według wynalazku zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwę receptorową tworzy wymienione wyżej przeciwciała zimmobilizowane na powierzchni złota wiązaniem kowalencyjnym za pośrednictwem linkera – cysteaminy.

Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia IL-6 w płynach ustrojowych w przykładzie realizacji został przedstawiony na rysunku, na którym fig. 1 i fig. 2 przedstawiają schemat biosensora, a fig. 3 pokazuje krzywą kalibracyjną IL-6 – zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia IL-6.

Biosensor (fig. 1 i 2) składa się z płytki szklanej typu BK-7 1 pokrytej warstwą złota (5 nm) 3 na podłożu chromu (1 nm) 2 oraz siatki polimeru 4 tworzącej pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwa receptorowa składa się z linkera – cysteaminy 5 oraz monoklonalnego mysiego antyciała specyficznego wobec IL-6 6 połączonego kowalencyjnie z linkerem. Warstwa receptorowa specyficznie wychwytuje IL-6 7 z badanego roztworu.

Biosensor jest specyficzny w tym sensie, że wychwytuje tylko marker IL-6 spośród setek innych substancji obecnych w płynach ustrojowych. Biosensor współpracujący z pomiarem SPRi zapewnia pomiary w zakresie stężeń dostosowanym do poziomu występującego w krwi i innych płynach ustrojowych.

Odpowiedź biosensora jest liniowa (fig. 3), co jest istotne dla dokładnego wyznaczenia wyniku. Biosensor zapewnia dobrą precyzję i dokładność pomiaru.

Biosensor w przykładzie działania został wykorzystany do oznaczania IL-6 w serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzonym rakiem jelita grubego.

3 μ L próbka osocza krwi jest наносzona na jedno z aktywnych miejsc biosensora. Próbkę pacjentów z rakiem jelita grubego były 10-krotnie rozcieńczone. Po upływie 10 min próbka jest 6-krotnie przemywana buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRi. Stężenie IL-6 odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

Z serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzonym rakiem jelita grubego otrzymano następujące wyniki:

Próbka 1	sygnał SPRi	2941,9	wynik 234,1 pg/mL
Próbka 2	sygnał SPRi	3142,9	wynik 250,0 pg/mL
Próbka 3	sygnał SPRi	2050,2	wynik 163,3 pg/mL
Próbka 4	sygnał SPRi	1978,5	wynik 157,5 pg/mL
Próbka 5	sygnał SPRi	2327,3	wynik 185,3 pg/mL
Próbka 6	sygnał SPRi	2848,3	wynik 226,6 pg/mL
Próbka 7	sygnał SPRi	2149,4	wynik 171,2 pg/mL
Próbka 8	sygnał SPRi	1708,3	wynik 136,1 pg/mL
Próbka 9	sygnał SPRi	2906,1	wynik 231,2 pg/mL

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia ludzkiego interleukiny 6 (IL-6) 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 monoklonalne mysie antyciało specyficzne wobec IL-6 (6) połączone kowalencyjnie z linkerem, w postaci cysteaminy (5), łączącym receptor z warstwą złota (3) na podłożu z chromu (2) pokrywającą płytkę szklaną (1).

Rysunki

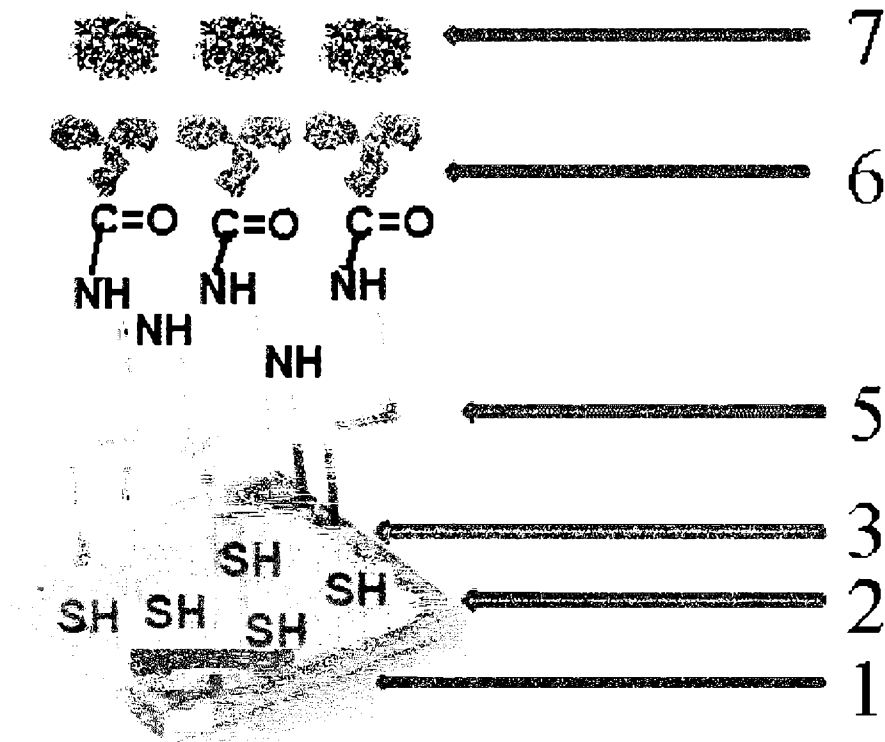


fig.1

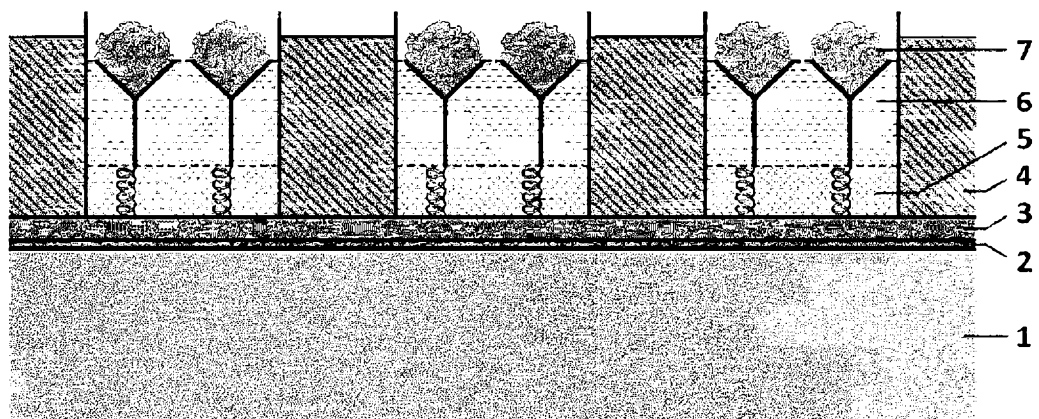


fig.2

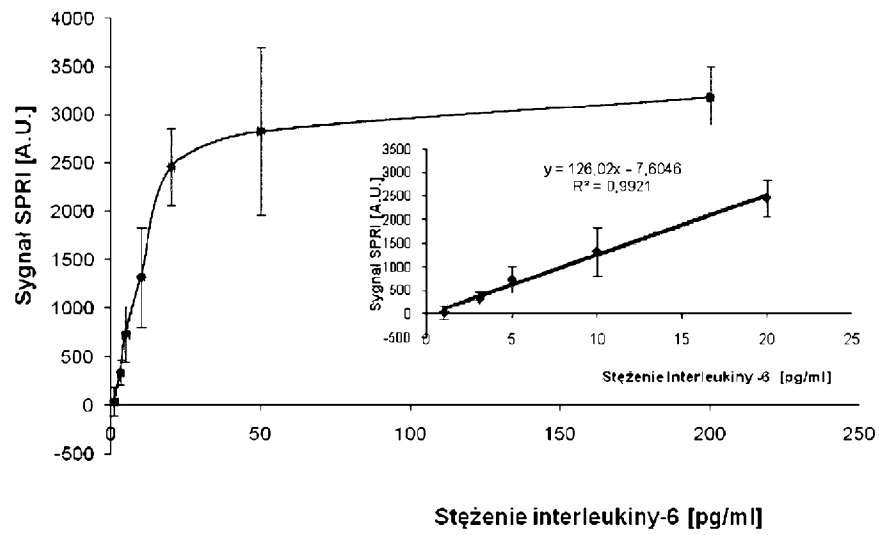


fig. 3