

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239339**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430495**

(22) Data zgłoszenia: **04.07.2019**

(51) Int.Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

(54) **Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia Katepsyny S w płynach ustrojowych
i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów
w wersji Imaging**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

11.01.2021 BUP 01/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

22.11.2021 WUP 34/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL

ANNA SANKIEWICZ, Białystok, PL

BOGDAN WYRWAS, Poznań, PL

ŁUKASZ OŁDAK, Kętrzyn, PL

ZENON ŁUKASZEWSKI, Kamionki, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Walkowiak

PL 239339 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania ludzkiej Katepsyny S w płynach ustrojowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging.

Katepsyna S jest enzymem biorącym udział w sekwencji skomplikowanych procesów biochemicznych prowadzących do reakcji autoimmunologicznych a farmakologiczne obniżenie jej stężenia (inhibicja) prowadzi do poprawy w np. w terapii toczenia rumieniowatego układowego (Thanei S., Theron M., Silva A. P., Reis B., Branco L., Schirmbeck L., Kolb F. A., Haap W., Schindler T., Trendelenburg M., *Cathepsin S inhibition suppresses autoimmune-triggered inflammatory responses in macrophages, Biochemical Pharmacology* 146 (2017) 151–164). Katepsyna S bierze aktywny udział w degradowaniu macierzy zewnątrzkomórkowej, przez co przyczynia się do inicjowania, bądź namnażania chorób takich jak: zapalenie stawów, miażdżyca tętnic, choroba obturacyjna płuc (O. Vasijsjeva, M. Dolinar, J. R. Pungercar, V. Turk, B. Turk: *Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans. FEBS Lett.* 2005; 579(5): 1285–1290). Stężenie Katepsyny S jest także wyraźnie podwyższone w przypadku nowotworów jelita grubego, trzustki i wątroby (Xu J., Li D., Ke Z. et al (2009) *Cathepsin S is aberrantly overexpressed in human hepatocellular carcinoma. Mol Med Rep* 2:713–718).

Gormley JA, Hegarty SM, O'Grady A et al (2011) *The role of cathepsin S as a marker of prognosis and predictor of chemotherapy benefit in adjuvant CRC: a pilot study. BrJCancer*105:1487–1494.

Shi W, Ogbomo SM, Wagh NK et al (2014) *The influence of linker length on the properties of cathepsin S cleavable (177)Lu-labeled HPMA copolymers for pancreatic cancer imaging. Biomaterials*35: 5760–5770). Katepsyna S także uczestniczy w angiogenezie i migracji komórek nowotworowych (Wang B, Sun J, Kitamoto S et al (2006) *Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. J Biol Chem* 281:6020–6029.

Sobotic B, Vizovisek M, Vidmar R et al (2015) *Proteomic identification of cysteine cathepsin substrates shed from the surface of cancer cells. Mol Cell Proteomics* 14:2213–2228).

Katepsyna S jest lizosomalną cysteinową proteazą zbudowaną z 225 aminokwasów o masie cząsteczkowej 24,8 kDa o optimum aktywności w zakresie pH 6,5–7,0 (Jadhav, P. K., Schiffer M. A., Gavardinas K., Kim K. E., Matthews D. P., Staszak M. A., Coffey D. S., Shaw B. W., Cassidy K. C., Brier R. A., Zhang Y., Christie R. M., Matter W. F., Qing K., Durbin J. D., Wang Y., Deng G. G., *Discovery of Cathepsin S Inhibitor LY3000328 for the Treatment of Abdominal Aortic Aneurysm, ACS Med. Chem. Lett.* 2014, 5,1138–1142) lub 6,5–7,5 (S. Gupta, R. Kumar Singh, S. Dastidar, A. Ray: *Cysteine cathepsin S as an immunomodulatory target: present and future trends. Expert Opin. Ther. Targets.* 2008; 12(3): 291–299). Katepsyna S jest wydzielana przez komórki układu odpornościowego (makrofagi, limfocyty B) w odpowiedzi na obecność prozapalnych substancji pośredniczących takich jak neutrofile, cytokiny (Jadhav, P. K., Schiffer M. A., Gavardinas K., Kim K. E., Matthews D. P., Staszak M. A., Coffey D. S., Shaw B. W., Cassidy K. C., Brier R. A., Zhang Y., Christie P. M., Matter W. F., Qing K., Durbin J. D., Wang Y., Deng G. G., *Discovery of Cathepsin S Inhibitor LY3000328 for the Treatment of Abdominal Aortic Aneurysm, ACS Med. Chem. Lett.* 2014, 5,1138–1142).

Poziom Katepsyny S w krwi jest określany jako aktywność enzymu (J. Cox, J. Troutt, M. Knierman, R. Siegel, Y. Qian, B. Ackermann, R. Konrad: *Determination of cathepsin S abundance and activity in human plasma and implications for clinical investigation. Anal. Biochem.* 2012, 430: 130–137) lub jako stężenie, które jest oznaczane za pomocą immunoenzymatycznego testu ELISA (J. Cox, J. Troutt, M. Knierman, R. Siegel, Y. Qian, B. Ackermann, R. Konrad: *Determination of cathepsin S abundance and activity in human plasma and implications for clinical investigation. Anal. Biochem.* 2012, 430: 130–137).

Test ELISA jest kilkuetapową metodą pośrednią wykorzystującą dwa antyciała oraz katalityczną reakcję barwną. Wieloetapowość procedury ELISA pociąga za sobą czasochłonność i zaledwie akceptowalną precyzję pomiaru.

Alternatywną możliwością oznaczania Katepsyny S jest zastosowanie biosensora i techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging) (SPRi). Została ona 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.,

Anal. 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, Sankiewicz et al, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016: 408, 5269–5276, Sankiewicz et al, *Anal. Biochem.*, 2016: 515, 40–46, Tokarzewicz et al, *Anal. Methods*, 2016: 8, 6428–6435, Tokarzewicz et al, *Anal. Methods*, 2017: 9, 2407–2414., Sankiewicz et al, *J. Pharmac. Biomed. Anal.*, 2018: 150, 1–8. 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 oznaczanie stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052 czy też PL222548. Dotychczas jednak nie opracowano biosensora SPRi do oznaczania Katepsyny S.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania Katepsyny S 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 monoklonalne szczurze przeciwciała specyficzne wobec Katepsyny S jako receptora i spełnia warunki analityczne pod względem zakresu pomiarowego, specyficzności, precyzji i dokładności pomiaru. Biosensor według wynalazku zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota na podłożu z tytanu 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 Katepsyny S w płynach ustrojowych w przykładzie realizacji został przedstawiony na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat biosensora, a fig. 2 pokazuje krzywą kalibracyjną Katepsyny S – zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia Katepsyny S.

Biosensor – jak pokazano na fig. 1 – składa się z płytki szklanej 1 pokrytej warstwą złota 3 na podłożu z tytanu 2 oraz siatki polimeru 4 tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwa receptorowa składa się z linkera – cysteaminy 5 oraz monoklonalnego szczurzego antyciała specyficznego na Katepsynę S 6 połączonego kowalencyjnie z linkerem. Warstwa receptorowa specyficznie wyłapuje Katepsynę S 7 z badanego roztworu.

Biosensor jest specyficzny w tym sensie, że wychwytuje tylko Katepsynę S 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. 2), co jest istotne dla dokładnego wyznaczenia wyniku. Biosensor zapewnia dobrą precyzję i dokładność pomiaru.

Biosensor w przykładzie działania został wykorzystany do oznaczania Katepsyny S w serii próbek osocza krwi pacjentek ze stwierdzonym rakiem jajnika oraz w serii próbek osocza krwi pochodzących od zdrowych dawców. Próbką osocza krwi pacjentek ze stwierdzonym rakiem jajnika jest rozcieńczana buforem PBS w stosunku 1:100. Na jedno z aktywnych miejsc biosensora jest nanoszona 3 μ L tego roztworu. Po upływie 10 min próbka jest 6-krotnie przemywana buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRi. Stężenie Katepsyny S odczytuje się z krzywej kalibracyjnej oraz uwzględnia rozcieńczenie.

Z serii próbek osocza krwi pacjentek ze stwierdzonym rakiem jajnika otrzymano następujące wyniki:

Próbka 1	sygnał SPRi	4167	wynik	126 ng/mL
Próbka 2	sygnał SPRi	4361	wynik	134 ng/mL
Próbka 3	sygnał SPRi	4404	wynik	136 ng/mL
Próbka 4	sygnał SPRi	4153	wynik	125 ng/mL
Próbka 5	sygnał SPRi	4339	wynik	133 ng/mL
Próbka 6	sygnał SPRi	4189	wynik	127 ng/mL

Próbki osocza krwi zdrowych dawców są rozcieńczane buforem PBS w stosunku 1:50 a dalsze postępowanie jest analogiczne jak wyżej. Z serii próbek osocza krwi zdrowych dawców otrzymano następujące wyniki:

Próbka 1	sygnał SPRi	3168	wynik	41,1 ng/mL
----------	-------------	------	-------	------------

Próbka 2	sygnał SPRi	3153	wynik	40,7 ng/mL
Próbka 3	sygnał SPRi	3294	wynik	43,8 ng/mL
Próbka 4	sygnał SPRi	3120	wynik	40,0 ng/mL
Próbka 5	sygnał SPRi	3074	wynik	39,0 ng/mL
Próbka 6	sygnał SPRi	3181	wynik	41,3 ng/mL

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia Katepsyny S 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 szczurze przeciwciało specyficzne wobec Katepsyny S (6) połączone kowalencyjnie z linkerem (5), w postaci cysteaminy, łączącym receptor z warstwą złota (3) umieszczoną na podłożu z tytanu (2) pokrywającym płytkę szklaną (1).

Rysunki

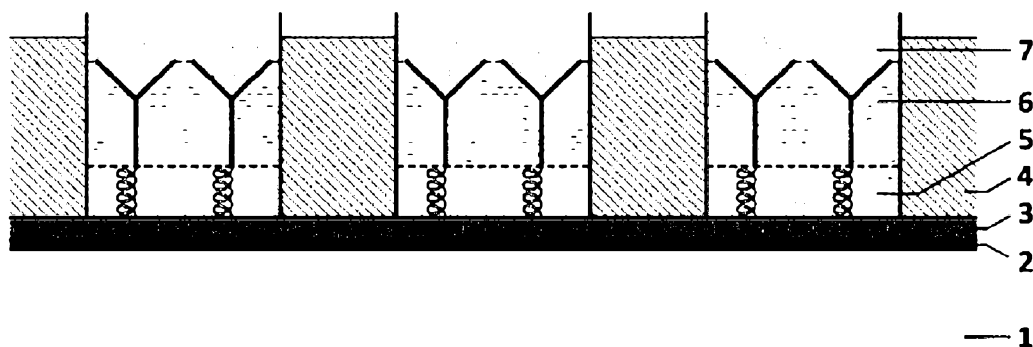


fig. 1

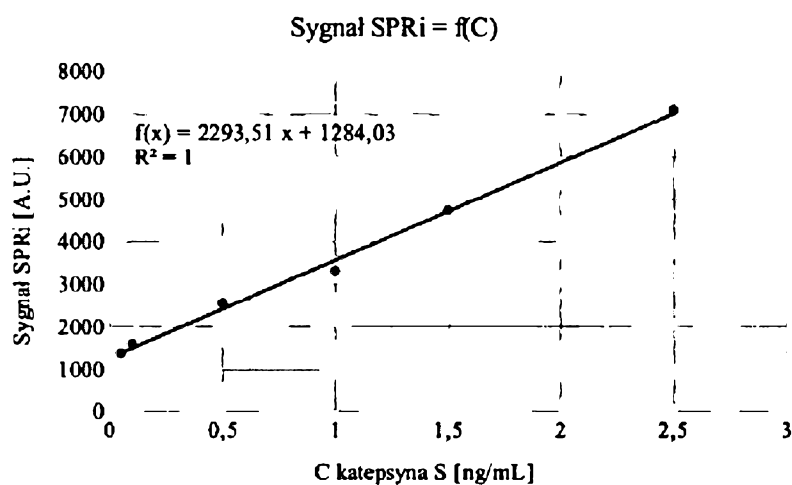


fig. 2