

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **222549**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **398307**

(22) Data zgłoszenia: **05.03.2012**

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

(54) **Biosensor do oznaczania aromatazy z wykorzystaniem inhibitora**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

16.09.2013 BUP 19/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

31.08.2016 WUP 08/16

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Medyczny
W Białymstoku, Białystok, PL
UNIwersytet W Białymstoku,
Białystok, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
PIOTR LAUDAŃSKI, Białystok, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Paweł Miniuk

PL 222549 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do oznaczania aromatazy. Aromataza jest enzymem należącym do rodziny cytochromu P450. Katalizuje reakcje hydroksylacji prowadzącą do powstania estrogenów. Poznanie mechanizmów regulujących lokalną ekspresję i aktywność aromatazy przyczynia się do lepszego zrozumienia procesów istotnych dla rozwoju estrogenozależnego raka piersi oraz ognisk endometriozy – Czajka i Orawiec I., Simpson E.R., „Aromatase research and its clinical significance”, *Pol.J. Endocrinolog*, (2010); 61(1); 126–134; Velasco I., Rueda J., Acien P., „Aromatase expression in endometriotic tissues and cell cultures of patients with endometriosis”, *Molecular Human Reproduction*, (2006) 12(6), 377–381; Dassen H., Punyadeera C., Kamps R., Delvoux B., Van Langendonck A., Donnez J., Husen B., Hole H., Dunselman G., Groothuis P., „Estrogen metabolizing enzymem in endometrium and endometriosis”, *Human Reproduction*, (2007) 22, 12, 3148–3158; Collette S., Lousse J.C., Defrere S., Curaba M., Heller J.F., Van Langendonck A., Mestdagt M., Foidart J.M., Loumaye E., Donnez J., „Absence of aromatase protein and mRNA expression in endometriosis”, *Human Reproduction*, (2009), 24(9), 2133–2141.

Eksemestan jest nieodwracalnym steroidowym inhibitorem aromatazy, zbliżonym strukturalnie do naturalnie występującego androstendionu. Charakteryzuje się specyficznym i selektywnym działaniem w stosunku do aromatazy – Boeddinghaus I.M., Dowsett M., „Comparative clinical pharmacology and pharmacokinetic interaction of aromatase inhibitors”, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 79 (2001), 85–91. Zmniejszenie stężenia estrogenów przez hamowanie aromatazy, stanowi skuteczny i wybiórczy sposób leczenia hormonozależnego raka piersi u kobiet po menopauzie – Lonning P.E. „Exemestane” a review of its clinical efficacy and safety”, *The Breast* (2001), 10, 198–208.

Technika rezonansu powierzchniowego plazmonów (Surface Plasmon Resonance Imaging) jest niezwykle skutecznym narzędziem do oznaczania biologicznie aktywnych związków, została przedstawiona m.in. Fernández-González A, Rychlowska J, Badia R, Salzer R, SPR imaging as a tool for detecting mucin – anti-mucin interaction. Outline of the development of a sensor for near-patient testing for mucin. *Microchim Acta*, 2007; 158: 219–225, Lee HJ, Yan Y, Marriott G, Corn RM, Quantitative functional analysis of protein complexes on surfaces. *J Physiol*, 2005; 563: 61–71, Lee HJ, Nedelkov D, Corn RM, 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 AW, Corn RM, 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. The Surface Plasmon Resonance Imaging Sensor for Papain Based on Immobilized Cystatin. *Protein Pept. Lett.*, 2007, 14, 443–445, Gorodkiewicz, E. Surface Plasmon Resonance Imaging sensor for cathepsin determination based on immobilized cystatin. *Protein Pept. Lett.*, 2009, 16, 1379–1385, Gorodkiewicz E, Regulaska E, Roszkowska-Jakimiec W, Determination of the active form concentration of cathepsins D and B by SPRI biosensors. *J Lab Diagn*, 2010; 46: 107–109(24), Gorodkiewicz E, Regulaska E, SPR Imaging Biosensor for Aspartyl Cathepsins: Sensor Development and Application for Biological Material. *Protein Pept Let* 2010; 17:1148–1154.

Istotą wynalazku jest biosensor do oznaczania aromatazy z wykorzystaniem inhibitora aromatazy techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów, który stanowi szkiełko korzystnie typu BK7, na które nałożona jest warstwa złota korzystnie o grubości 50 nm, korzystnie na podłożu chromu, charakteryzujący się tym, że posiada warstwę funkcjonalizowanego tiolu korzystnie oktadecylotiolu-ODM, na którą naniesiona jest warstwa inhibitora-eksemestanu, poszczególne partycje biosensora rozdzielone są siatką polimerową.

Dzięki zastosowaniu rozwiązania według wynalazku uzyskuje się bardzo szybką analizę badanego materiału na stężenie aromatazy.

Wynalazek w przykładowym wykonaniu został uwidoczniiony w schemacie na Fig. 1, natomiast Fig. 2 przedstawia krzywą kalibracyjną aromatazy z użyciem inhibitora-eksemestanu.

Fig. 1 przedstawia budowę przedmiotowego sensora, gdzie na szkiełku (1) korzystnie typu BK7 nałożona jest warstwa złota (2) korzystnie na podłożu chromu (3), następnie warstwa sfunkcjonalizowanego tiolu (4) na którą naniesiona jest warstwa inhibitora (5) oraz siatka polimeru (6) dzieląca sensor na partycje.

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 monowarstwy tiolu np. ODM a na niej utworzenie monowarstwy inhibitora aromatazy-eksemestanu w zakresie stężeń 0,01–5,00 ng/mL. Na poszczególne pola sensora zawierające dużą liczbę miejsc aktywnych np. 12, nakłada się wzorzec aromatazy tak aby uzyskać stężenia 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 ng/mL. Stężenia te odpowiadają prostoliniowemu odcinkowi krzywej kalibracyjnej aromatazy. Na wolne pola nakłada się próbkę homogenatów łożyska lub endometrium.

Roztwór homogenatu łożyska lub endometrium jest rozcieńczany dziesięciokrotnie buforem PBS o pH ok.7.0 i przenoszony na powierzchnię sensora na 10 minut. Objętość przenoszonego roztworu jest ok. 3 μ l. Powierzchnia sensora jest przemywana co najmniej sześciokrotnie buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRI. Stężenie aromatazy odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

P r z y k ł a d: Oznaczenie stężenia aromatazy w homogenatach łożyska.

Z próbki homogenatu łożyska otrzymano następujące wartości intensywności sygnału SPR dla poszczególnych miejsc aktywnych:

1. 4881
2. 4054
3. 5425
4. 5108
5. 4977
6. 5283
7. 4934
8. 4934
9. 4759
10. 4826
11. 4999
12. 5027

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

1. 44,8
2. 44,4
3. 54,6
4. 48,9
5. 46,6
6. 52,1
7. 45,8
8. 45,8
9. 42,6
10. 43,9
11. 47,0
12. 47,5

Średnie stężenie wynosi 47,0 ng/mL.

Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności $\alpha=0,05$ wynosi 0,95

Średni wynik określono ($47,0 \pm 0,95$) ng/ml.

Zastrzeżenie patentowe

Biosensor do oznaczania aromatazy z wykorzystaniem inhibitora aromatazy techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów, który stanowi szkiełko korzystnie typu BK7, na które nałożona jest warstwa złota, korzystnie o grubości 50 nm, korzystnie na podłożu chromu, **znamienny tym**, że posiada warstwę funkcjonalizowanego tiolu (4) korzystnie octadecylotiolu-ODM, na którą nałożona jest warstwa inhibitora-eksemestanu (5) na którą nałożona jest siatka polimeru (6) dzieląca sensor na partycje.

Rysunki

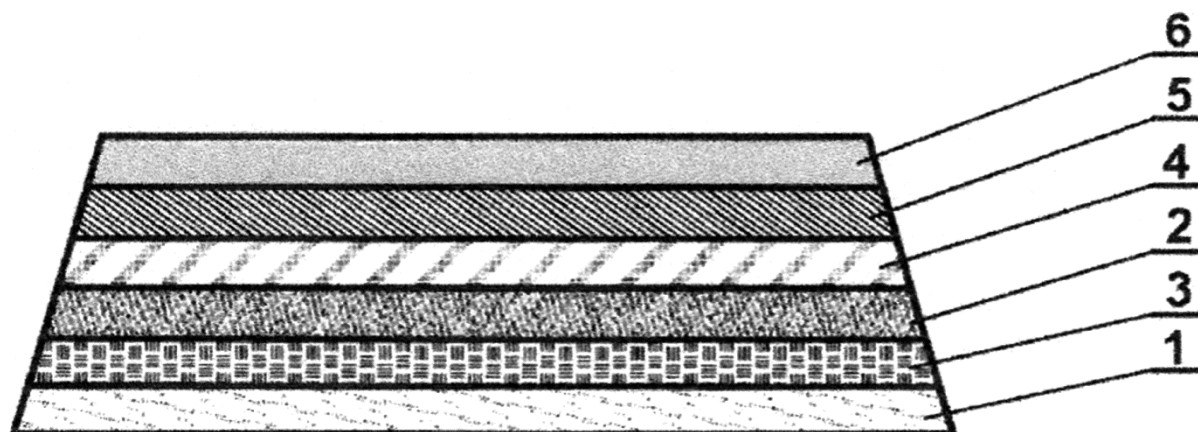


Fig. 1

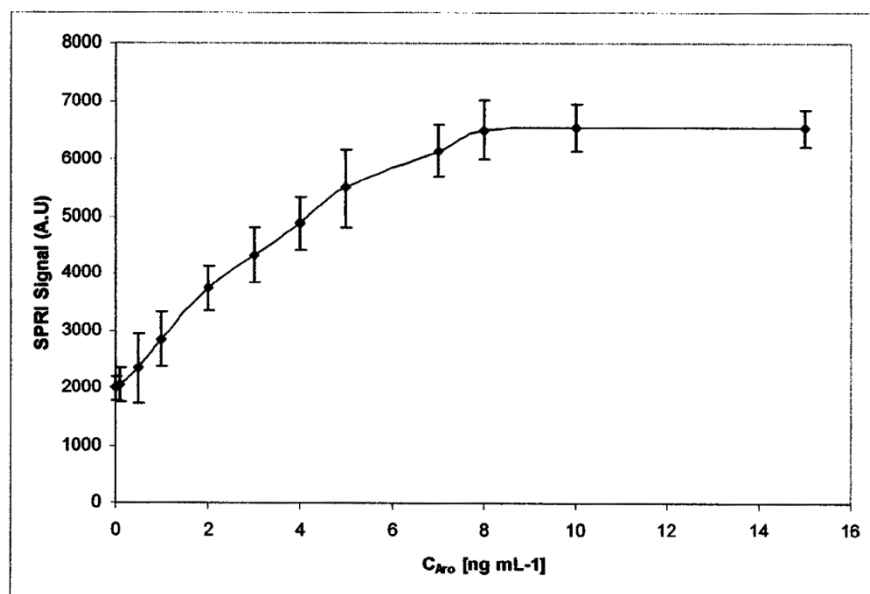


Fig.2 Krzywa kalibracyjna aromatazy