

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **223400**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **397281**

(22) Data zgłoszenia: **08.12.2011**

(51) Int.Cl.  
**G01N 33/53 (2006.01)**  
**G01N 33/00 (2006.01)**  
**G01N 21/27 (2006.01)**  
**G01N 21/55 (2006.01)**

(54)

**Biosensor do oznaczania podoplaniny**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**10.06.2013 BUP 12/13**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**31.10.2016 WUP 10/16**

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL**  
**UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU, Białystok, PL**  
**UNIWERSYTET MEDYCZNY, Białystok, PL**  
**GORODKIEWICZ EWA, Białystok, PL**  
**NIKLIŃSKI JACEK, Białystok, PL**  
**CHARKIEWICZ RADOSŁAW, Hajnówka, PL**  
**ŁUKASZEWSKI ZENON, Poznań, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL**  
**JACEK NIKLIŃSKI, Białystok, PL**  
**RADOSŁAW CHARKIEWICZ, Hajnówka, PL**  
**ZENON ŁUKASZEWSKI, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Barbara Urbańska-Łuczak**

**PL 223400 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do oznaczania podoplaniny. Podoplanina ludzka znana także jako Ta1alfa-2, antygen PA2.26 lub gp36 jest stosunkowo małą glikoproteiną o masie atomowej 38 kDa, której budowę opisują m.in. Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Munoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M: Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 2005; 113: 899–910, Zimmer G, Oeffner F, Von Messling V, Tschernig T, Gröness HJ, Klenk HD, Herrler G: Cloning and characterization of gp36, a human mucin-type glycoprotein preferentially expressed in vascular endothelium. *Biochem J*, 1999; 341: 277–284, Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D: Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol*, 1997; 151: 1141–1152. Fizjologiczne funkcje podoplaniny są opisane m.in. przez Rishi AK, Joyce-Brady M, Fisher J, Dobbs LG, Floros J, VanderSpek J, Brody JS Williams MC: Cloning, characterization, and development expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives. *Dev Biol*, 1995; 167: 294–306, Boucherot A, Schreiber R, Pavenstädt H, Kunzelmann K: Cloning and expression of the mouse glomerular podoplanin homologue gp38P. *Nephrol Dial Transplant*, 2002; 17: 978–984, Wang Y, Sun J, Gu Y, Zhao S, Groome U, Alexander JS: D2-40/podoplanin expression in the human placenta. *Placenta*, 2011; 32: 27–32, Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, Diem K, Weninger W, Tschachler E, Alitalo K, Kerjaschki D: Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*, 1999; 154: 385–394, Ordóñez NG: Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*, 2006; 13: 83–88. Podoplanina jest specyficznym markerem służącym do identyfikacji naczyń limfatycznych w badaniach histopatologicznych, o czym donoszą Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M: Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors, *Am J Pathol*, 2005; 166: 913–921, Ordóñez NG: Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*, 2006; 13: 83–88. Podoplanina jest uważana za perspektywiczny marker nowotworowy, o czym donoszą Kimura N, Kimura I: Podoplanin as a marker for mesothelioma. *Pathol Int*, 2005; 55: 83–86, Idrees M, Saxena R, Cheng L, Ulbright TM, Badve S: Podoplanin, a novel marker for seminoma: A comparison study evaluating immunohistochemical expression of podoplanin and OCT3/4. *Ann Diagn Pathol*, 2010; 14: 331–6, Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M: Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*, 2005; 26: 195–200. Ekspresja podoplaniny jest związana z procesem limfoangiogenezy tj. formowania nowych naczyń limfatycznych. Komórki nowotworowe przemieszczają się tymi naczyniami powodując przerzuty. Donoszą o tym Chuang WY, Yeh G, Wu YC, Chao YK, Liu YH, Tseng CK, Chang HK, Liu HP, Hsueh C: Tumor cell expression of podoplanin correlates with nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol*, 2009; 24: 1021–1027, Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G: Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*, 2006; 9: 261–272.

Technika rezonansu powierzchniowego plazmonów (Surface Plasmon Resonance Imaging) jest niezwykle skutecznym narzędziem do oznaczania biologicznie aktywnych związków, została przedstawiona m.in. Ma W., Kantarjian H., Zhang X., Wang X., Estrov Z., O'Brien S., Albitar M.: Ubiquitin-proteasome system profiling in acute leukemias and its clinical relevance. *Leuk Res*. 2011; 35: 526–33, 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.*

Let., 2009, 16, 1379–1385, Gorodkiewicz E, Regulska 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), Inhibitor Z-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-H (PSI) specyficznie wiąże Proteasom S20. Problem ten został przedstawiony min. Gorodkiewicz E, Regulska E, SPR Imaging Biosensor for Aspartyl Cathepsins: Sensor Development and Application for Biological Material. *Protein Pept Let* 2010; 17: 1148–1154, Kisselev AF, Goldberg AL: Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* 2001; 8: 739-58, Wilk S, Figueiredo-Pereira ME. Synthetic inhibitors of the multicatalytic proteinase complex (proteasome). *Enzyme Protein* 1993, 47: 306–313, Groll, M., Huber, R., Inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome core particle: a structural approach. *Biochim. Biophys. Acta* 2004;1695, 33–44, de Bettignies G, Coux O. Proteasome inhibitors: Dozens of molecules and still counting. *Biochimie*, 2010, 92(11):1530–1545.

Istotą wynalazku jest biosensor do oznaczania podoplaniny z wykorzystaniem przeciwciała owcy IgG specyficznego dla podoplaniny korzystnie techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów, który składa się ze szkiełka korzystnie typu BK7 z warstwą złota korzystnie o grubości 50 nm na podłożu chromu, następnie umieszczona jest warstwa funkcjonalizowanego tiolu korzystnie cysteaminy, a na niej warstwa przeciwciała owcy IgG specyficznego dla podoplaniny, na którą to nałożona jest siatka polimeru dzieląca sensor na partycje.

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

Wynalazek w przykładowym wykonaniu został uwidoczniiony na rysunkach, gdzie fig. 1 przedstawia w schemacie szkiełka, fig. 2 przedstawia krzywą kalibracyjną podoplaniny w osoczu krwi.

Biosensor do oznaczania podoplaniny z wykorzystaniem przeciwciała owcy IgG specyficznego dla podoplaniny korzystnie techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów, który składa się ze szkiełka 1, korzystnie typu BK7 z warstwą złota 2, korzystnie o grubości 50 nm na podłożu chromu 3, następnie umieszczona jest warstwa funkcjonalizowanego tiolu 4 korzystnie cysteaminy, a na niej warstwa przeciwciała owcy IgG specyficznego dla podoplaniny 5, na którą to nałożona jest 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. cysteaminy, a na niej utworzenie monowarstwy przeciwciała owcy (IgG) specyficznego dla podoplaniny w zakresie stężeń 0,05–0,5 ng/mL. Na poszczególne pola sensora zawierające dużą liczbę miejsc aktywnych np. 12, nakłada się wzorzec podoplaniny tak aby uzyskać stężenia 0,05; 0,1; 0,2; 0,3, 0,4 i 0,5 ng/MI. Stężenia te odpowiadają prostoliniowemu odcinkowi krzywej kalibracyjnej podoplaniny. Na wolne pola nakłada się próbkę osocza krwi. Przed nałożeniem osocze jest poddawane trzykrotnemu sączeniu np. przez bibułę filtracyjną o średniej gęstości. W przypadku próbek zawierających bardzo wysokie stężenia podoplaniny, osocze jest rozcieńczane buforem fosforanowym o pH = 7,4, tak aby otrzymany wynik mieścił się w zakresie krzywej kalibracyjnej (np 10 krotnie). Po upływie czasu interakcji (minimum 10 min) biosensor płucze się dokładnie buforem HBS-ES i wodą i mierzy się sygnał SPRI. Na podstawie odczytanej różnicy pomiędzy intensywnością sygnałów SPRI przed położeniem próbki z podoplaniną i po nałożeniu próbki odczytuje się stężenie podoplaniny.

P r z y k ł a d: Oznaczenie stężenia podoplaniny w osoczu krwi

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

1.	2614
2.	2654
3.	2589
4.	2696
5.	2902
6.	2623
7.	2799
8.	2585
9.	2536
10.	2845
11.	2741
12.	2798

Odczytane z krzywej stężenia podoplaniny z uwzględnieniem rozcieńczenia np. 10 razy, wynoszą odpowiednio:

1. 1,7 ng/ml
2. 1,7 ng/mL
3. 1,6 ng/ml
4. 1,8 ng/mL
5. 2,2 ng/mL
6. 1,7 ng/ml
7. 2,0 ng/mL
8. 1,6 ng/mL
9. 1,5 ng/ml
10. 2,1 ng/mL
11. 1,9 ng/ml
12. 2,0 ng/ml

Średnie stężenie wynosi 1,85 ng/mL.

Obliczony przedział ufności dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  wynosi 0,18.

Średni wynik określono  $(1,85 \pm 0,18)$  ng/ml.

### Zastrzeżenie patentowe

Biosensor do oznaczania podoplaniny z wykorzystaniem przeciwciała owcy IgG specyficznego dla podoplaniny techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów, który zawiera szkiełko, korzystnie typu BK7 z warstwą złota na podłożu chromu oraz siatkę polimeru dzielącą sensor na partycje, **znamienny tym**, że na szkiełku (1) z warstwą złota (2) na podłożu chromu (3) umieszczona jest monowarstwa sfunkcjonalizowanego tiolu (4), korzystnie cysteaminy, a na niej monowarstwa przeciwciała owcy IgG specyficznego dla podoplaniny (5), na którą to monowarstwę (5) nałożona jest siatka polimeru (6) dzieląca sensor na partycje.

Rysunki

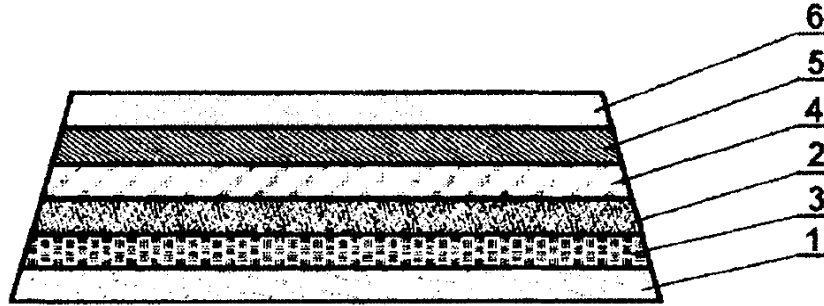


Fig. 1

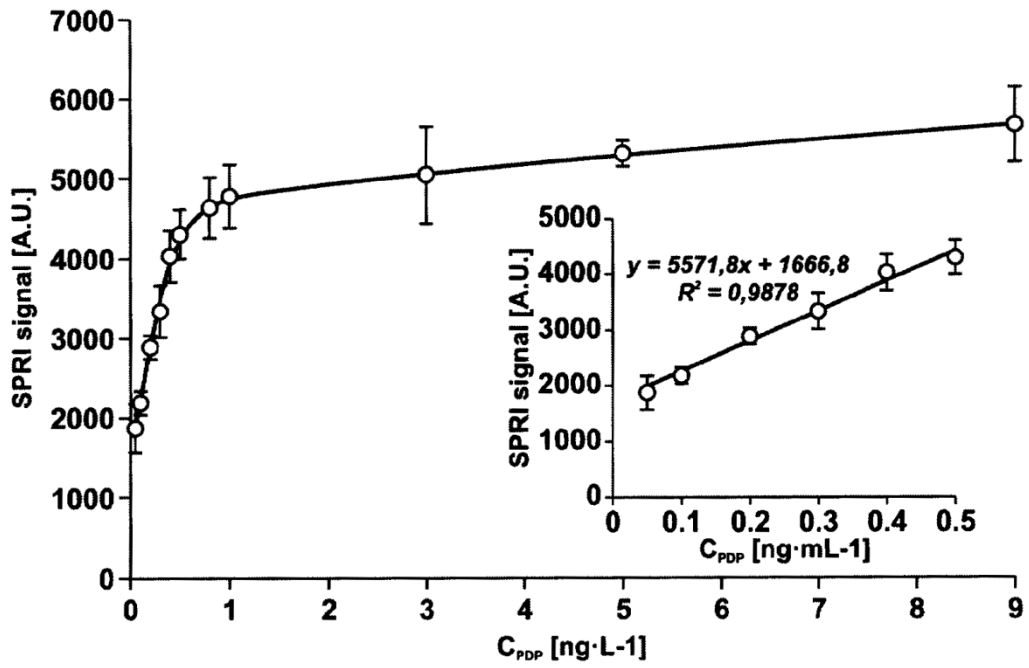


Fig. 2

