

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **210052**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **384463**

(51) Int.Cl.
G01N 31/22 (2006.01)
C12Q 1/25 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **14.02.2008**

(54) **Sensor, zwłaszcza do akumulacji i ilościowego oznaczania katepsyn**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
17.08.2009 BUP 17/09

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.11.2011 WUP 11/11

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL
UNIwersytet W BIAŁYMSTOKU,
Białystok, PL
GORODKIEWICZ EWA, Białystok, PL
ŁUKASZEWSKI ZENON, Poznań, PL
WOJTULEWSKI KAZIMIERZ, Białystok, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
ZENON ŁUKASZEWSKI, Poznań, PL
KAZIMIERZ WOJTULEWSKI, Białystok, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Barbara Urbańska-Łuczak

PL 210052 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sensor, zwłaszcza do akumulacji i ilościowego oznaczania katepsyn.

Katepsyny, czyli proteazy lizosomalne są enzymami, które pełnią ważną rolę w degradacji białek, w rozpadach komórek, w procesach hormonalnych, itp. W przypadku rozwoju nowotworu nasila się rozpad komórek i następuje znaczne zwiększenie stężenia katepsyn w płynach ustrojowych, na przykład w krwi. Zatem katepsyny są markerem nowotworowym. Dlatego istotny jest rozwój metod oznaczania katepsyn. Oznaczanie katepsyn staje się cennym narzędziem analizy medycznej. Podwyższone stężenia katepsyn wykryto w przypadku większości chorób nowotworowych. Dane na ten temat zebrała Berdowska w przeglądzie opublikowanym w *Clinica Chimica Acta* 2004 roku (tom strony 41-69). Ważną barierą w rutynowym oznaczaniu katepsyn w płynach ustrojowych i tkankach jest niedostateczne zaawansowanie metod analitycznych ich oznaczania. Są one pracochłonne, nie wykazujące wystarczających limitów detekcji oraz powtarzalności wyników. Najczęściej stosuje się testy ELISA oparte na stosowaniu przeciwciał poliklonalnych lub monoklonalnych skoniugowanych z odpowiednim enzymem. Według publikacji Cohen, Fruitier-Arnaudin, Gerreau-Balandier i Piot opublikowanej w *Analytica Chimica Acta* w roku 2003 (tom 486, strony 21-29), limity detekcji oznaczania katepsyn za pomocą testów ELISA są rzędu 5 nM t.j. około $125 \mu\text{g l}^{-1}$ lub 125 ppb przyjmując masę cząsteczkową około 25 kDa. Podobne limity detekcji stosując metody fluorymetryczne uzyskali Pimenta, Oliveira, Juliano i Juliano, o czym donoszą w publikacji z roku 2001 w *Biochemidica and Biophysica Acta* (tom 1544, strony 113-122). Jak donoszą Chu, Jones i Zeece w publikacji w *Electrophoresis* wydrukowanej w 1999 roku, metoda elektroforezy kapilarnej z zastosowaniem fluoryzującej hemoglobiny znaczonej barwnikiem Oregon Green, pozwala na oznaczenie aktywności katepsyny D z limitem detekcji około 1 nanomola 1^{-1} t.j. około $25 \mu\text{g l}^{-1}$ lub 25 ppb (tom 14, strony 2945-2951). Kaszuba, Peliński, Kozłowska, J.Zaczyńska-Janeczko, Kusiba-Charaziak i A.Kaszuba opisali w roku 2001 w *Postęпах Dermatologii i Alergologii* spektrofotometryczną metodę oznaczania katepsyn B i H, która polega na oznaczaniu benzoilo-DL-arginylo-p-nitrozo aniliny uwalnianej przez enzym z N- α -benzoilo-DL-arginylo-p-nitro-anilidu (tom 21, strony 190-199).

Literatura patentowa dotycząca katepsyn koncentruje się głównie na zastrzeżeniach różnych inhibitorów katepsyn (J.S.Tung, Sukanto Sina, L.Mcconlogue, G.Tatsuno, J.Anderson, C. M.F. Semko, S.Chrysler, Novel cathepsin and methods and composition for inhibition thereof, E.P. 831920, Data publik. 04/01/ 1998;

P.N.Edwards, C.Johnstone, M.S.Large, J.Oldfield, H.Tucker, Acetamidoacetonitrile derivatives as inhibitors of cathepsin L and/or cathepsin S, EP 1155010, Data publik. 11/21/2001;

M.Quibell, S.Taylor, Furanone derivatives as inhibitors of cathepsin S, EP1413580, Data publik. 04/28/2004;

P.N.Edwards, C.Johnstone, M.S.Large, J.Oldfield, H.Tucker, Di- and tripeptide nitrile derivatives as inhibitors of cathepsin L and cathepsin S, EP 1155011, Data publ. 11/21/2001 Zhu, De-Min, Uckun Fatih M., Cathepsin inhibitors in cancer treatment, US20040005329, Data publik., 01/08/2004;

Uckun Fatih M., Zhu, De-Min, Cathepsin inhibitors in cancer treatment, US6605589, Data publik., 08/12/2003;

M.Quibell, S.Taylor, Furanone derivatives as inhibitors of cathepsin S, EP1178986, Data publik. 02/13/2002;

A.Chatterjee, M.Roberts, P.Alper, H.Liu, D.Tully, R.Epple, Inhibitors of cathepsin S, US20050049244, Data publik., 03/03/2005;

D. Tully, H.Liu, B.Bursulaya, J.Li, J.L.Harris, R.Epple, A.Chatterjee, J.Williams, Inhibitors of cathepsin S, US20040198780, Data publik., 10/07/2004;

D.S.Karanewsky, P.Alper, H.Liu, Inhibitors of cathepsin S, US20050107368, Data publik., 05/19/2005).

Urządzenie do oznaczania Katepsyny K zostało przedstawione (D.Claveau, J.A.Mancini, D.Riendeau, Whole cell assay for cathepsin K, EP 1214444, Data publik., 06/19/2002).

Istotą wynalazku jest sensor, zwłaszcza do akumulacji i ilościowego oznaczania katepsyn korzystnie techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów, którego stanowi szkiełko korzystnie typu BK7, na które nałożona jest warstwa złota, korzystnie na podłożu chromu, następnie warstwa funkcjonalizowanego tiolu korzystnie cysteaminy, a na nią warstwa cystatyny korzystnie białka kurzego albo stefiny, na którą nałożona jest siatka polimeru dzieląca sensor na partycje.

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

Przedmiot wynalazku w przykładowym wykonaniu został uwidoczniony w schemacie na fig. 1, natomiast fig. 2 przedstawia krzywą kalibracyjną Katepsyny B.

Sensor jest urządzeniem, które specyficznie akumuluje Katepsyny na powierzchni sensora pozwalając na ich ilościowe oznaczenie. Oznaczenie zakumulowanych Katepsyn może być dokonane na przykład techniką powierzchniowego rezonansu plazmonowego.

Sensor składa się z szkiełka i korzystnie typu BK7, na które nałożona jest warstwa złota 2, korzystnie o grubości 50 μm , korzystnie na podłożu chromu 3, następnie warstwa funkcjonalizowanego tiolu 4 korzystnie cysteaminy, a na nią warstwa cystatyny korzystnie białka kurzego albo stefiny 5, na którą nałożona jest siatka polimeru 6 dzieląca sensor na partycje.

Akumulacja Katepsyn następuje przez naniesienie kropli płynu ustrojowego na przykład osocza krwi, moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego, limfy na powierzchnię sensora, na siatkę polimeru 6 i spłukanie. Limit detekcji w przypadku oznaczania techniką powierzchniowego rezonansu plazmonowego (wersja *imaging*) wynosi $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$ tj. około 4 femtomoli ml^{-1} .

Sensor działa współpracując z urządzeniem do pomiarów techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji *Imaging* (SPRI). Sensor kładzie się na pryzmacie urządzenia. W poszczególne pola sensora nakłada się wzorec odpowiedniej Katepsyny (np. Katepsyny B) tak, aby uzyskać stężenia 0.5, 1.0, 1.5 i 2.0 ng/ml na poszczególnych polach zawierających dużą liczbę miejsc aktywnych np. 12. Stężenia te odpowiadają prostoliniowemu odcinkowi krzywej kalibracyjnej Katepsyn. Na wolne pola wyznaczone przez siatkę polimerową 6 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 Katepsyn, osocze jest rozcieńczane buforem fosforanowym o $\text{pH} = 7,4$, tak aby otrzymany wynik mieścił się w zakresie krzywej kalibracyjnej (nawet 100 krotnie). Po upływie czasu interakcji (minimum 10 min) biosensor płucze się dokładnie wodą i mierzy się sygnał SPRI. Na podstawie odczytanej różnicy pomiędzy intensywnością sygnałów SPRI przed położeniem próbki z Katepsynami i po nałożeniu próbki odczytuje się stężenie Katepsyn.

Przykład krzywej kalibracyjnej przedstawia fig. 2. Każdy z punktów pomiarowych powstał w wyniku obliczenia średniej z dużej liczby pomiarów (9-12). Duża liczba pomiarów umożliwia wyznaczenie przedziałów ufności poszczególnych punktów.

Zastrzeżenie patentowe

Sensor, zwłaszcza do akumulacji i ilościowego oznaczania Katepsyn, korzystnie techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów, **znamienny tym**, że stanowi go szkiełko (1) korzystnie typu BK7, na które nałożona jest warstwa złota (2), korzystnie na podłożu chromu (3), następnie warstwa funkcjonalizowanego tiolu (4) korzystnie cysteaminy, a na nią warstwa nystatyny, korzystnie białka kurzego albo stefiny (5), na którą nałożona jest siatka polimeru (6) dzieląca sensor na partycje.

Rysunki

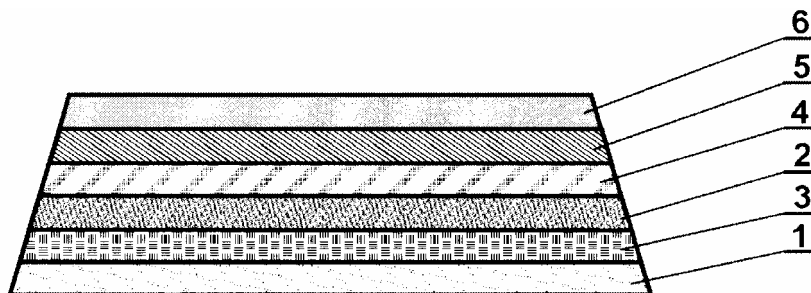


Fig. 1

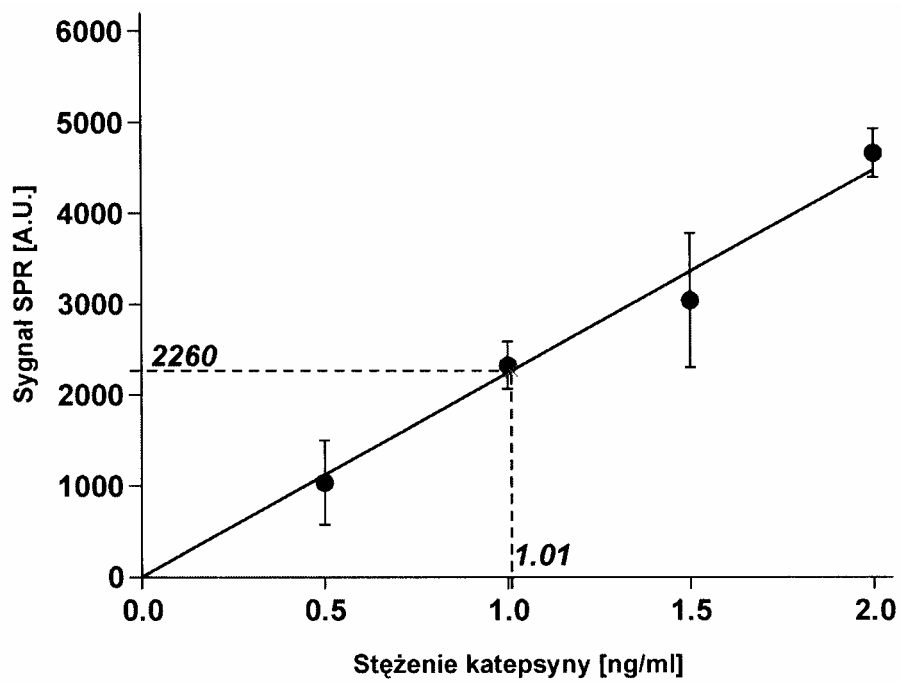


fig. 2