(19) URZĄD PATENTOWY RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

(10) **PL 247217 B1**

(12) # Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **444478**
(22) Data zgłoszenia: **2023.04.19**
(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2024.10.21 BUP 43/2024**
(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.06.02 WUP 22/2025**

(51) MKP:
G01N 33/543 *(2006.01)*
G01N 33/68 *(2006.01)*
G01N 21/55 *(2014.01)*

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET W BIAŁYMSTOKU, Białystok, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
ŁUKASZ OŁDAK, Białystok, PL
EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Marcin Walkowiak, Dobra, PL

(54) Tytuł:
Biosensor do specyficznego oznaczania białka fosfo-Tau p181 z wykorzystaniem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej Imagining

PL 247217 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor, wykorzystujący jako metodę detekcji powierzchniowy rezonans plazmonowy do ilościowych i selektywnych oznaczeń białka fosfo-Tau p181 w ludzkim materiale biologicznym.

Aktualnie brakuje wiarygodnych biomarkerów służących zarówno do diagnostyki, jak i prognozowania chorób neurodegeneracyjnych, do których zaliczana jest także choroba Alzheimera (AD). Nie ma również środków farmakologicznych, które byłyby w stanie leczyć tę chorobę. Dlatego tak istotne jest, aby opracować wysoce selektywne metody oznaczania ilości fosfo-Tau p-181 – Ding, X.; Zhang, S.; Jiang, L.; Wang, L.; Li, T.; Lei, P. Ultrasensitive Assays for Detection of Plasma Tau and Phosphorylated Tau 181 in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Transl. Neurodegener. 2021, 10, 1–14.

Najnowsze badania dowodzą, że oznaczenia całkowitego białka Tau w osoczu są przydatne klinicznie. Podwyższone jego poziomy związane są ze spadkiem zdolności poznawczych i podwyższonym ryzykiem utraty tych zdolności. Uważa się również, iż fosforylowane Tau jest jeszcze bardziej specyficzne dla patogenezy choroby Alzheimera niż Tau całkowite – Mielke, M.M.; Hagen, C.E.; Xu, J.; Chai, X.; Vemuri, P.; Lowe, V.J.; Airey, D.C.; Knopman, D.S.; Roberts, R.O.; Machulda, M.M.; et al. Plasma Phospho-Tau181 Increases with Alzheimer's Disease Clinical Severity and Is Associated with Tau- and Amyloid-Positron Emission Tomography. Alzheimer's Dement. 2018, 14, 989–997.

P-Tau 181 można stosować do odróżniania AD od grupy kontrolnej, a nawet od otępienia czołowo-skroniowego (FTD), otępienia z ciałami Lewy'ego (DLB) oraz dużej depresji – Hampel, H.; Blennow, K.; Shaw, L.M.; Hoessler, Y.C.; Zetterberg, H.; Trojanowski, J.Q. Total and Phosphorylated Tau Protein as Biological Markers of Alzheimer's Disease. Exp. Gerontol. 2010, 45, 30–40.

Stężenia p-Tau 181 w płynie mózgowo-rdzeniowym są związane ze spadkiem funkcji poznawczych u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami funkcji poznawczych – Buerger, K.; Teipel, S.J.; Zinkowski, R.; Blennow, K.; Arai, H.; Engel, R.; Hofmann-Kiefer, K.; McCulloch, C.; Ptok, U.; Heun, R.; et al. CSF Tau Protein Phosphorylated at Threonine 231 Correlates with Cognitive Decline in MCI Subjects. Neurology. 2002, 59, 627–629 – oraz zmianami w korze nowej u chorych na AD – Buerger, K.; Ewers, M.; Pirttilä, T.; Zinkowski, R.; Alafuzoff, I.; Teipel, S.J.; DeBernardis, J.; Kerkman, D.; McCulloch, C.; Soininen, H.; et al. CSF Phosphorylated Tau Protein Correlates with Neocortical Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease. Brain. 2006, 129, 3035–3041.

Ponad to, poziomy p-Tau 181 mogą służyć do przewidywania tempa spadku funkcji poznawczych w różnych stadiach AD – Blom, E.S.; Giedraitis, V.; Zetterberg, H.; Fukumoto, H.; Blennow, K.; Hyman, B.T.; Irizarry, M.C.; Wahlund, L.O.; Lannfelt, L.; Ingelsson, M. Rapid Progression from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's Disease in Subjects with Elevated Levels of Tau in Cerebrospinal Fluid and the Apoe E4/E4 Genotype. Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 2009, 27, 458–464.

Potwierdzono również przydatność diagnostyczną p-Tau 181 w płynie mózgowo rdzeniowym. Białko to z dokładnością wynoszącą 80%, jako pojedynczy biomarker, było w stanie przewidzieć AD u pacjentów z łagodnymi zaburzeniami funkcji poznawczych, w krótkim, ale istotnym klinicznie, 1.5 rocznym przedziale czasowym – Ewers, M.; Buerger, K.; Teipel, S.J.; Scheltens, P; Schröder, J.; Zinkowski, R.P.; Bouwman, F.H.; Schönknecht, P.; Schoonenboom, N.S.M.; Andreasen, N.; et al. Multicenter Assessment of CSF-Phosphorylated Tau for the Prediction of Conversion of MCI. Neurology. 2007, 69, 2205–2212.

Diagnostyka p-Tau opiera się aktualnie na oznaczeniach ilościowych p-Tau 181 za pomocą tzw. sandwich ELISA co przedstawią publikacje Hampel, H.; Blennow, K.; Shaw, L.M.; Hoessler, Y.C.; Zetterberg, H.; Trojanowski, J.Q. Total and Phosphorylated Tau Protein as Biological Markers of Alzheimer's Disease. Exp. Gerontol. 2010, 45, 30–40; Wang, J.; Zhang, Y.R.; Shen, X.N.; Han, J.; Cui, M.; Tan, L.; Dong, Q.; Zubarev, R.A.; Yu, J.T. Deamidation-Related Blood Biomarkers Show Promise for Early Diagnostics of Neurodegeneration. Biomark. Res. 2022, 10; Ding, X.; Zhang, S.; Jiang, L.; Wang, L.; Li, T.; Lei, P. Ultrasensitive Assays for Detection of Plasma Tau and Phosphorylated Tau 181 in Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. Transl. Neurodegener. 2021, 10, 1–14; Rosso, S.M.; Van Herpen, E.; Pijnenburg, Y.A.L.; Schoonenboom, N.S.M.; Scheltens, P.; Heutink, P.; Van Swieten, J.C. Total Tau and Phosphorylated Tau 181 Levels in the Cerebrospinal Fluid of Patients with Frontotemporal Dementia Due to P301L and G272V Tau Mutations. Arch. Neurol. 2003, 60, 1209–1213; Tsantzali, I.; Foska, A.; Sideri, E.; Routsi, E.; Tsomaka, E.; Kitsos, D.K.; Zompola, C.; Bonakis,

A.; Giannopoulos, S.; Voumvourakis, K.I.; et al. Plasma Phospho-Tau-181 as a Diagnostic Aid in Alzheimer's Disease. Biomedicines. 2022, 10, 1879 oraz Hampel, H.; Buerger, K.; Zinkowski, R.; Teipel, S.J.; Goernitz, A.; Andreasen, N.; Sjoegren, M.; DeBernardis, J.; Kerkman, D.; Ishiguro, K.; et al. Measurement of Phosphorylated Tau Epitopes in the Differential Diagnosis of Alzheimer Disease: A Comparative Cerebrospinal Fluid Study. Arch. Gen. Psychiatry. 2004, 61, 95–102.

Konstrukcja nowego biosensora czułego na p-Tau 181 stanowi więc krok rozwojowy metod diagnostycznych AD. Detekcja oparta jest natomiast o Powierzchniowy Rezonans Plazmonowy w wersji obrazowej, którego istota oraz najnowsze trendy i zastosowania aplikacyjne przedstawione zostały w pracach:

- Gorodkiewicz, E.; Lukaszewski, Z. Recent Progress in Surface Plasmon Resonance Biosensors (2016 to Mid-2018). Biosensors. 2018, 8, 1–18;
- Amine, A.; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. Recent Advances in Biosensors Based on Enzyme Inhibition. Biosens. Bioelectron. 2016, 76, 180–194;
- Bockovaacute, M.; Slabyacute, J.; Scaronpringer, T.; Homola, J. Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging and Microscopy and Their Biological Applications. Annu. Rev. Anal. Chem. 2019, 12, 151–176;
- Wang, D.; Loo, J.F.C.; Chen, J.; Yam, Y.; Chen, S.C.; He, H.; Kong, S.K.; Ho, H.P. Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors. Sensors. 2019, 19, 1266;
- Jebelli, A.; Oroojalian, F.; Fathi, F.; Mokhtarzadeh, A.; Guardia, M. de la Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Biosensors for MicroRNAs Detection. Biosens. Bioelectron. 2020, 169, 112599;
- Bonyár, A. Label-Free Nucleic Acid Biosensing Using Nanomaterial-Based Localized Surface Plasmon Resonance Imaging: A Review. ACS Appl. Nano Mater. 2020, 3, 8506–8521;
- Wu, W.; Yu, X.; Wu, J.; Wu, T.; Fan, Y.; Chen, W.; Zhao, M.; Wu, H.; Li, X.; Ding, S. Surface Plasmon Resonance Imaging-Based Biosensor for Multiplex and Ultrasensitive Detection of NSCLC-Associated Exosomal MiRNAs Using DNA Programmed Heterostructure of Au-on-Ag. Biosens. Bioelectron. 2021, 175, 112835.

Biosensor wychwytuje wyłącznie oznaczaną substancję z roztworu, a aparatura 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 oznaczenia stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052 czy też PL222548. Dotychczas jednak nie opracowano biosensora SPRi do oznaczeń fosfo-Tau p181.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania fosfo-Tau p181 w płynach ustrojowych (osocze/surowica), lub homogenatach tkankowych dostosowany do współpracy z techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging). Opracowany biosensor wykorzystuje monoklonalne królicze przeciwciało specyficzne na fosforylowane białko Tau (p-Tau 181) jako ligand, czyli element wychwytujący analit (p-Tau 181) z roztworu próbki. Biosensor zawiera płytkę szklaną podzieloną na partycje za pomocą siatki polimerowej i pokrytą warstwą złota na podłożu tytanu oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwę receptorową stanowi monoklonalne królicze przeciwciało specyficzne na fosforylowane białko Tau (p-Tau 181) połączone kowalencyjnie z linkerem, w postaci cysteaminy, łączącym receptor z warstwą złota na podłożu tytanu pokrywających płytkę szklaną. Biosensor ten spełnia warunki analityczne pod względem zakresu pomiarowego, specyficzności, precyzji i dokładności pomiaru.

Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia fosfo-Tau p181 w płynach ustrojowych w przykładzie realizacji, został przedstawiony na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia widok schematyczny biosensora a fig. 2 prezentuje krzywą kalibracyjną p-Tau 181 – zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia p-Tau 181.

Biosensor do specyficznego oznaczania fosfo-Tau p181 w płynach ustrojowych w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, składa się z płytki szklanej 1 pokrytej warstwą złota 3 na podłożu tytanu 2 oraz siatki polimeru 4 tworzącej dziewięć miejsc aktywnych (w matrycy 3x3), podzielonych na dwanaście punktów w każdym z dziewięciu miejsc aktywnych zawierających warstwę ligandu, który jest związany z powierzchnią biosensora za pomocą linkera – cysteaminy 5 oraz monoklonalnego króliczego przeciwciała

specyficznego na p-Tau 181 6 połączonego kowalencyjnie z linkerem. Ligand specyficznie wyłapuje p-Tau 181 7 z badanego roztworu.

Fig. 2 prezentuje krzywą kalibracyjną fosfo-Tau p181 – zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia p-Tau 181. Biosensor współpracujący z pomiarem SPRi zapewnia pomiary w zakresie stężeń dostosowanym do poziomu występującego w krwi i innych płynach ustrojowych. Odpowiedź biosensora jest liniowa, co jest istotne dla dokładnego wyznaczenia wyniku. Biosensor zapewnia dobrą precyzję i dokładność pomiaru. Poza tym, wykazuje granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), pozwalające na ilościowy pomiar stężenia p-Tau 181 w ludzkich płynach ustrojowych – LOD =1.12 pg/mL, LOQ = 3.35 pg/mL.

Biosensor jest specyficzny w tym sensie, że wychwytuje tylko p-Tau 181 spośród setek innych substancji obecnych w płynach ustrojowych. Mierzalnym parametrem specyficzności jest wyznaczona wartość odzysku* mieszcząca się w granicach 91.55 – 109.94%.

$$* \; odzysk = \frac{C_1}{C_0} \cdot 100\,\%$$

$C_0 - znana ilość\ analitu\ w\ badanej\ próbce$

$C_1 - oznaczona ilość\ analitu\ w\ badanej\ próbce$

Precyzja pomiaru, dokonywanego za pomocą biosensora SPRi czułego na p-Tau 181, sprawdzona została poprzez 3-krotny pomiar znanych stężeń roztworów standardowych (3; 5; 10; 12 pg/mL) oraz 3-krotne powtórzenie pomiaru stężenia p-Tau 181 w próbce rzeczywistej. Obliczono współczynnik zmienności (CV)**, którego wartość dla roztworów standardowych waha się w granicach 4.18 – 7.75%, natomiast dla roztworu próbki rzeczywistej wynosi 4.86%. Ponieważ współczynnik ten jest mniejszy niż 25%, pomiary stężenia p-Tau za pomocą biosensora uznano za precyzyjne. Wyznaczono również wartości odzysków (tylko roztwory rzeczywiste), które znajdują się w zakresie 98.16 – 116.96%.

$$** \; CV = \frac{SD}{C_{średnie}} \cdot 100\,\%$$

$SD - odchylenie\ standardowe$

$C_{średnie} - średnia\ arytmetyczna\ stężenia\ z\ 3\ powtórzeń\ pomiaru$

Powtarzalność pomiaru za pomocą biosensora zbadana została poprzez 3-krotne powtórzenie pomiaru stężenia p-Tau 181 w próbce rzeczywistej – zarówno pochodzącej od osoby chorej, jak i osoby z grupy kontrolnej. Powtarzalność określono za pomocą CV, który dla próbki pochodzącej od osoby chorej wyniósł 3.18%, natomiast dla próbki od osoby z grupy kontrolnej był równy 4.26%. Wartości CV wskazują na powtarzalny pomiar stężenia p-Tau 181 w próbkach rzeczywistych, z wykorzystaniem biosensora SPRi.

Biosensor w przykładzie działania został wykorzystany do oznaczania fosfo-Tau p181 w serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzoną chorobą Alzheimera oraz w serii próbek osocza krwi pochodzących od grupy kontrolnej, którą stanowili nałogowi palacze. Próbki nie wymagały specjalnego przygotowania i rozcieńczenia na potrzeby analizy za pomocą biosensora SPRi. Na jedno z aktywnych miejsc biosensora nanoszono 3 μL próbki. Po upływie 5 min próbka była 6-krotnie przemywana buforem HBS-ES oraz wodą destylowaną. Mierzy się sygnał SPRi, a stężenie p-Tau 181 odczytuje się bezpośrednio z krzywej kalibracyjnej.

Z serii próbek osocza otrzymano następujące wyniki:

Próbka 1	wynik: 6.01 pg/mL
Próbka 2	wynik: 9.47 pg/mL
Próbka 3	wynik: 5.74 pg/mL
Próbka 4	wynik: 8.15 pg/mL
Próbka 5	wynik: 9.61 pg/mL
Próbka 6	wynik: 5.27 pg/mL

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania p-Tau 181 w płynach ustrojowych w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką matrycowego powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który zawiera płytkę szklaną podzieloną na partycje za pomocą siatki polimerowej i pokrytą warstwą złota na podłożu tytanu oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową, **znamienny tym**, że warstwę receptorową stanowi monoklonalne królicze przeciwciało specyficzne na fosforylowane białko Tau (p-Tau 181) jako ligand (6) połączone kowalencyjnie z linkerem, w postaci cysteaminy (5), łączącym receptor z warstwą złota (3) na podłożu tytanu (2) pokrywających płytkę szklaną (1).

Rysunki

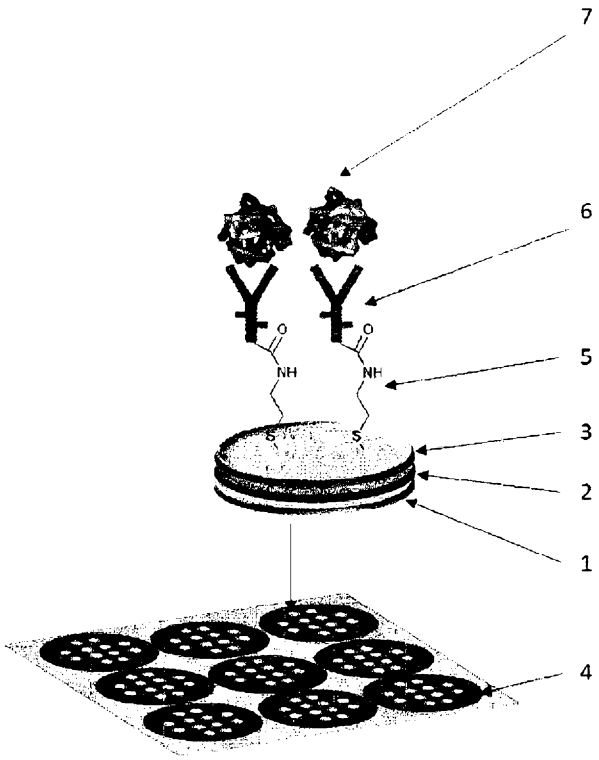

fig.1

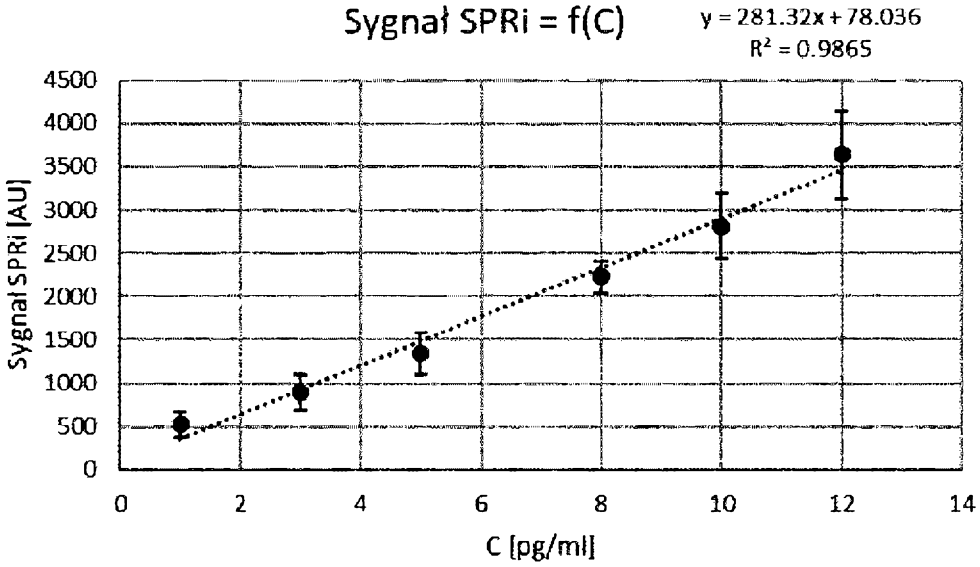
Sygnał SPRi = f(C)
y = 281.32x + 78.036
R² = 0.9865
Sygnał SPRi [AU]
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
12
14
C [pg/ml]

fig. 2