

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 448841 A1

(12)

Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **448841**(22) Data zgłoszenia: **2024.06.14**(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2025.12.15 BUP 50/2025**

(51) MKP:

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

(71) Zgłaszający:

**UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL
GUSZCZ, Białystok, PL**

(72) Twórca(-y):

**ŁUKASZ OŁDAK, Białystok, PL
EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
TOMASZ GUSZCZ, Białystok, PL**

(74) Pełnomocnik:

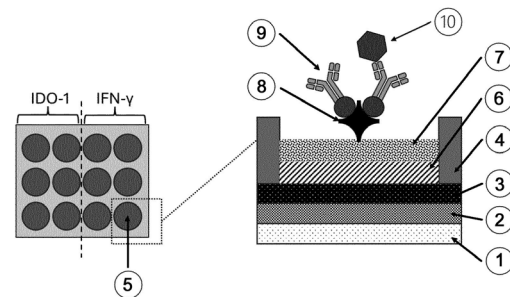
rzecz. pat. Marcin Walkowiak, Dobra, PL

(54) Tytuł:

Biosensor do specyficznego i jednoczesnego oznaczania 2,3-diksygenazy indolaminy IDO-1 oraz interferonu gamma IFN- γ w ludzkim materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging

(57) Skrót opisu:

Przedmiotem zgłoszenia jest biosensor do specyficznego i jednoczesnego oznaczania 2,3-diksygenazy indolaminy IDO-1 oraz interferonu gamma IFN- γ w ludzkim materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który stanowi płytkę szklaną pokrytą warstwą złota na podłożu tytanu oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwę receptorową stanowią biotynylowane monoklonalne królicze przeciwciała specyficzne na IDO-1 lub IFN- γ (9), zimmobilizowane na powierzchni złota (3) pokrytej hydrofobową folią o grubości 20 μm (4), tworzącą dwanaście miejsc aktywnych (5) w matrycy 4x3, przy czym przeciwciała (9) połączone jest z 50 nm warstwą złota (3), umieszczoną na 1 nm warstwie tytanu (2) pokrywającą płytkę szklaną (1), poprzez oddziaływanie ze streptawidyną (8), która wiązaniem kowalencyjnym związana jest z warstwą karboksymetylodeksylanu (7) za pośrednictwem linkera w postaci 3-merkaptto-1-olu (6).



Biosensor do specyficznego i jednoczesnego oznaczania 2,3-dikosygenazy indolaminy IDO-1 oraz interferonu gamma IFN- γ w ludzkim materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging

Przedmiotem wynalazku jest biosensor, wykorzystujący jako metodę detekcji powierzchniowy rezonans plazmonowy do jednoczesnych i selektywnych oznaczeń 2,3-dikosygenazy indolaminy (IDO-1) oraz interferonu gamma (IFN- γ) w ludzkim materiale biologicznym.

L-tryptofan (L-Trp) jest jednym z najważniejszych aminokwasów i nieustannie ulega procesowi metabolizmu. Proces ten zapoczątkowany oraz kontrolowany jest przez enzym IDO-1, którego poziom ekspresji zależy natomiast od IFN- γ . Wzrost ekspresji IDO-1 wywołany działaniem IFN- γ uruchamia szlak kinureninowy metabolizmu L-Trp, który prowadzi do syntezy najważniejszych metabolitów L-Trp, czyli kinureniny (KYN), 3-hydroksykinureniny (3-HK) oraz kwasu 3-hydroksyantranilowego (3-HAA). Fiore, A.; Murray, P.J. Tryptophan and Indole Metabolism in Immune Regulation. *Curr Opin Immunol* 2021, 70, 7–14, doi:10.1016/J.COI.2020.12.001.

Ekspresja IDO-1 regulowana jest przez odpowiednie szlaki sygnalizacyjne, przy udziale także IFN- γ . W mikro środowisku nowotworu IDO-1 działa immunosupresyjnie i ma związek z progresją nowotworu. Fujiwara, Y.; Kato, S.; Nesline, M.K.; Conroy, J.M.; DePietro, P.; Pabla, S.; Kurzrock, R. Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Inhibitors and Cancer Immunotherapy. *Cancer Treat Rev* 2022, 110, 102461, doi:10.1016/J.CTRV.2022.102461.

W organizmie ludzkim enzym ten ulega konstytutywnej ekspresji m.in. w komórkach śródbłonna łożyska i płuc, komórkach nabłonka żeńskich narządów płciowych, komórkach w narządach limfatycznych oraz komórkach β wysp trzustkowych u osób zdrowych. Wspomniana zależność ekspresji IDO-1 zależna od IFN- γ może stanowić mechanizm odpowiedzi przeciwzapalnej, który jest szeroko wykorzystywany przez nowotwory dla ułatwienia tzw. ucieczki immunologicznej. Pallotta, M.T.; Rossini, S.; Suvieri, C.; Coletti, A.; Orabona, C.;

Macchiarulo, A.; Volpi, C.; Grohmann, U. Indoleamine 2,3-Dioxygenase 1 (IDO1): An up-to-Date Overview of an Eclectic Immunoregulatory Enzyme. *FEBS J* 2022, 289, 6099–6118, doi:10.1111/FEBS.16086. Poza tym, IDO-1 to ważny enzym kontrolujący układ odpornościowy, dzięki czemu IDO-1 odpowiada za regulację istotnych funkcji fizjologicznych i przyczynia się do modulacji patogenezы i nasilenia stanów zapalnych, chorób zakaźnych, zaburzeń alergicznych oraz autoimmunologicznych, chorób neurologicznych i nowotworowych. Yeung, A.W.S.; Terentis, A.C.; King, N.J.C.; Thomas, S.R. Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Health and Disease. *Clin Sci (Lond)* 2015, 129, 601–672, doi:10.1042/CS20140392.

Każda ze znanych cytokin wykazuje działanie prozapalne lub przeciwzapalne oraz regulacyjne. Spora grupa z nich może wywoływać te dwa efekty jednocześnie. Taką cytokiną jest m.in. IFN- γ , który uznany jest za cytokinę immunostymulującą. Ponad to, IFN- γ wywołuje nadekspresję cząsteczek przeciwzapalnych, w tym wcześniej wielokrotnie wspomnianej cząsteczki IDO-1. Sam IFN- γ wytwarzany jest głównie przez komórki NK (ang. *natural killer*), komórki T CD4⁺ i CD8⁺ oraz komórki NKT. IFN- γ i IDO-1 działają synergistycznie i przy tym przyczyniają się do szybszego rozkładu L-Trp, a dzięki temu są niezwykle istotne w obronie przeciwwirusowej, a poza tym, podnoszą odporność na patogeny wewnątrzkomórkowe. Fallarino, F.; Grohmann, U.; Puccetti, P. Indoleamine 2,3-Dioxygenase: From Catalyst to Signaling Function. *Eur J Immunol* 2012, 42, 1932–1937, doi:10.1002/EJI.201242572.

Biorąc zatem pod uwagę opisane wyżej funkcje i wzajemne zależności między IDO-1 a IFN- γ w organizmie ludzkim, zasadne jest opracowanie nowej metody jednoczesnych oznaczeń IDO-1 oraz IFN- γ w ludzkich płynach ustrojowych. Obecnie, analiza ilościowa IDO-1 możliwa jest do przeprowadzenia jedynie testem ELISA. Zoga, M.; Oulis, P.; Chatzipanagiotou, S.; Masdrakis, V.-G.; Pliatsika, P.; Boufidou, F.; Foteli, S.; Soldatos, C.-R.; Nikolaou, C.; Papageorgiou, C. Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Immune Changes Under Antidepressive Treatment in Major Depression in Females. *In Vivo* 2014, 28, 633-

638. Większość badań nad poziomem tego enzymu skupia się na pomiarach jego aktywności, poprzez wyznaczenie stosunku stężeń KYN do L-Trp, Wongpraparut, N.; Pengchata, P.; Piyophiprapong, S.; Panchavinnin, P.; Pongakasira, R.; Arechep, N.; Kasetsinsombat, K.; Maneechotesuwan, K. Indoleamine 2,3 Dioxygenase (IDO) Level as a Marker for Significant Coronary Artery Disease. BMC Cardiovasc Disord 2021, 21, 1-10, doi:10.1186/S12872-021-02140-0, co stwarza trudność w postaci konieczności opracowania metod oznaczeń zarówno KYN, jak i L-Trp. Pozostałe metodyki badania aktywności IDO-1 również w pewnym stopniu powiązane są z syntezą KYN z L-Trp. Przykładowo, opracowano metodę spektrofotometryczną, w której o aktywności IDO-1 świadczy ilość mierzonego żółtego barwnika pochodzącego z KYN. Inna metoda opiera się na oznaczaniu powstających *in situ* fluoroforów pochodzących z N-formylkinureny (produkt pośredni między L-Trp a KYN). Test NFK GreenScreen™, który działa w oparciu o powstające na drodze rozpadu L-Trp do KYN i w obecności odczynnika NFK GreenScreen™ cząsteczki emitujące fluorescencję, także wykorzystywany jest do oznaczania aktywności IDO-1. Zhao, Y.; Wang, B.; Liu, J.; Sun, P.; Liu, H. An Overview on the Methods of Determining the Activity of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase 1. J Drug Target 2019, 27, 724–731, doi:10.1080/1061186X.2018.1523416.

W przypadku analiz ilościowych IFN- γ najszerszej wykorzystuje się metody elektrochemiczne. W literaturze obecne są opisy biosensorów do oznaczeń IFN- γ , za pomocą których dokonywano oznaczeń w ślinie - Sánchez-Tirado, E.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J.M. Electrochemical Immunosensor for the Determination of the Cytokine Interferon Gamma (IFN- γ) in Saliva. Talanta 2020, 211, 120761, doi:10.1016/J.TALANTA.2020.120761 i surowicy Ruecha, N.; Shin, K.; Chailapakul, O.; Rodthongkum, N. Label-Free Paper-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Human Interferon Gamma Detection. Sens Actuators B Chem 2019, 279, 298–304, doi:10.1016/J.SNB.2018.10.024 oraz biosensorów, które zostały opracowane, ale nie użyto ich do oznaczeń IFN- γ w próbkach rzeczywistych, jak opisano w

pracach: Dijkma, M.; Kamp, B.; Hoogvliet, J.C.; Van Bennekom, W.P. Development of an Electrochemical Immunosensor for Direct Detection of Interferon- γ at the Attomolar Level. *Anal Chem* 2001, 73, 901–907, doi:10.1021/AC001051H/ASSET/IMAGES/LARGE/AC001051HF00008.JPEG; Wang, X.; Han, X.; Ma, A.; Chen, L.; Liang, H.; Litifu, A.; Xue, F. Fabrication of Electrochemical Immunosensor for Interferon- γ Determination and Its Application of Tuberculosis Diagnosis. *Int J Electrochem Sci* 2017, 12, 7262–7271, doi:10.20964/2017.08.67; Xia, J.; Song, D.; Wang, Z.; Zhang, F.; Yang, M.; Gui, R.; Xia, L.; Bi, S.; Xia, Y.; Li, Y.; et al. Single Electrode Biosensor for Simultaneous Determination of Interferon Gamma and Lysozyme. *Biosens Bioelectron* 2015, 68, 55–61, doi:10.1016/J.BIOS.2014.12.045 oraz Januariae, K.C.; Uhuo, O. V.; Iwuoha, E.; Feleni, U. Recent Advances in the Detection of Interferon-Gamma as a TB Biomarker. *Anal Bioanal Chem* 2022, 414, 907–921, doi:10.1007/S00216-021-03702-Z/TABLES/3.

Poza metodami oznaczeń wykorzystujących biosensory elektrochemiczne, badacze korzystali z elektroforezy kapilarnej, Hang, H.; Jin, W. Determination of Different Forms of Human Interferon- γ in Single Natural Killer Cells by Capillary Electrophoresis with on-Capillary Immunoreaction and Laser-Induced Fluorescence Detection. *Electrophoresis* 2004, 25, 1090–1095, doi:10.1002/ELPS.200305803, aptasensora fluorescencyjnego, Chen, P.; Peng, W.; Qu, R.; He, Y.; Liu, T.; Huang, J.; Ying, B. Fluorescence Aptasensor of Tuberculosis Interferon- γ in Clinical Samples Regulated by Steric Hindrance and Selective Identification. *Anal Chem* 2022, 94, 9122–9129, doi:10.1021/ACS.ANALCHEM.2C01530/ASSET/IMAGES/LARGE/AC2C01530_0005.JPEG, cytometrii przepływowej Carrock Sewell, W.A.; North, M.E.; Webster, A.D.B.; Farrant, J. Determination of Intracellular Cytokines by Flow-Cytometry Following Whole-Blood Culture. *J Immunol Methods* 1997, 209, 67–74, doi:10.1016/S0022-1759(97)00150-6 i multipleksowego testu immunologicznego. Lieberman, J.A.; Moscicki, A.B.; Sumerel, J.L.; Ma, Y.; Scott, M.E. Determination of Cytokine Protein Levels in Cervical Mucus Samples

from Young Women by a Multiplex Immunoassay Method and Assessment of Correlates. *Clinical and Vaccine Immunology* 2008, 15, 49–54, doi:10.1128/CVI.00216-07. Aktualnie, nie opracowano jeszcze biosensora do jednoczesnych oznaczeń IDO-1 i IFN- γ w próbkach rzeczywistych. Opracowanie nowego biosensora do jednoczesnych oznaczeń IDO-1 i IFN- γ stanowi więc krok rozwojowy w kierunku metod oznaczeń tych dwóch białek, od których zależy jeden z najważniejszych procesów życiowych w stanach fizjologicznych i patologicznych, a więc metabolizm tryptofanu.

Detekcja oparta jest natomiast o Powierzchniowy Rezonans Plazmonowy w wersji obrazowej, którego istota oraz najnowsze trendy i zastosowania aplikacyjne przedstawione zostały w pracach m.in.:

- Gorodkiewicz, E.; Lukaszewski, Z. Recent Progress in Surface Plasmon Resonance Biosensors (2016 to Mid-2018). *Biosensors* 2018, 8, 1–18, doi:10.3390/bios8040132.
- Amine, A.; Arduini, F.; Moscone, D.; Paleschi, G. Recent Advances in Biosensors Based on Enzyme Inhibition. *Biosensors and Bioelectronics* 2016, 76, 180–194, doi:10.1016/j.bios.2015.07.010;
- Bockovaacute, M.; Slabyacute, J.; Scaronpringer, T.; Homola, J. Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging and Microscopy and Their Biological Applications. *Annual Review of Analytical Chemistry* 2019, 12, 151–176, doi: 10.1146/annurev-anchem-061318-115106;
- 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, doi: 10.3390/s19061266;
- Jebelli, A.; Oroojalian, F.; Fathi, F.; Mokhtarzadeh, A.; de la Guardia, M. Recent Advances in Surface Plasmon Resonance Biosensors for MicroRNAs Detection. *Biosens Bioelectron* 2020, 169, 112599, doi: 10.1016/j.bios.2020.112599;
- 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, doi: 10.1021/acsanm.0c01457;

- czy 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, doi:10.1016/j.bios.2020.112835.

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 oznaczanie stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052, czy też PL222548.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego i jednoczesnego oznaczania 2,3-dikosygenazy indolaminy IDO-1 oraz interferonu gamma IFN- γ w ludzkim materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging. Opracowany biosensor wykorzystuje biotynylowane monoklonalne królicze przeciwciała specyficzne na IDO-1 lub IFN- γ jako ligand (warstwa receptorowa), czyli element wychwytyjący analit (IDO-1 lub IFN- γ) z roztworu próbki. Biosensor według wynalazku zawiera płytkę szklaną, pokrytą 50 nm warstwą złota, umieszczoną na 1 nm warstwie tytanu, oraz przyklejoną do złotej powierzchni hydrofobową i odporną chemicznie cienką folię o grubości 20 μm , która tworzy dwanaście odrębnych miejsc aktywnych – w matrycy 3x4, z którymi na drodze reakcji chemicznych, sprzęgana jest warstwa ligandów. Ligandami są wymienione wyżej przeciwciała, zimmobilizowane na powierzchni złota poprzez oddziaływania ze streptawidyną, która wiązaniem kowalencyjnym związana jest z warstwą karboksymetylodekstranu. Funkcję łącznika karboksymetylodekstranu (a zatem i

całej reszty biosensora) z warstwą metaliczną (złoto) stanowi 3-merkapto-1-ol.

Biosensor do jednoczesnego oznaczania stężenia IDO-1 i IFN- γ w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych w przykładzie realizacji, został przedstawiony na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat biosensora a fig. 2 prezentuje krzywą kalibracyjną metody jednoczesnych oznaczeń IDO-1 i IFN- γ - zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia IDO-1 lub IFN- γ .

Biosensor do specyficznego i jednoczesnego oznaczania 2,3-diksygenazy indolaminy IDO-1 oraz interferonu gamma IFN- γ w ludzkim materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging składa się z płytki szklanej 1 pokrytej 1 nm warstwą tytanu 2, 50 nm warstwą złota 3 oraz hydrofobowej folii 4 tworzącej dwanaście miejsc aktywnych (w matrycy 4x3) - przykład miejsca aktywnego 5. Na każdym z nich, znajduje się warstwa linkera – 3-merkapto-1-olu 6 stanowiąca łącznik między warstwą metaliczną a pozostałymi częściami biosensora. Do warstwy linkera przyłączona jest warstwa karboksymetylodekstranu 7, z którą wiązaniem kowalencyjnym związana jest streptawidyna 8. Biotynolowany ligand specyficzny dla IDO-1 lub IFN- γ 9 oddziałuje ze streptawidyną na zasadzie oddziaływań fizykochemicznych, charakteryzujących się wysokim powinowactwem biotyny do streptawidyny. Ligand specyficznie wyłapuje IDO-1 lub IFN- γ 10 z badanego roztworu.

Fig. 2 rysunku prezentuje krzywą kalibracyjną metody jednoczesnych oznaczeń IDO-1 (A) i IFN- γ (B)- zmienność liniową sygnału w zależności od stężenia IDO-1 lub IFN- γ . Biosensor SPRi zapewnia pomiary w zakresie stężeń dostosowanym do poziomu występującego w krwi i innych płynach ustrojowych oraz homogenatach tkankowych. 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 IDO-1 oraz IFN- γ w ludzkich płynach ustrojowych – $LOD_{IDO-1} = 0.27 \text{ ng/mL}$, $LOQ_{IDO-1} = 0.81 \text{ ng/mL}$; $LOD_{IFN-\gamma} = 1.76 \text{ pg/mL}$, $LOQ_{IFN-\gamma} = 5.29 \text{ pg/mL}$.

Biosensor jest specyficzny w tym sensie, że wychwytuje tylko IDO-1 oraz IFN- γ spośród innych substancji obecnych w płynach ustrojowych. Mierzalnym parametrem specyficzności jest wyznaczona wartość stężenia IDO-1 i IFN- γ w próbce standardowej, w której znajdowała się mieszanina białek o stężeniach 5 ng/mL, ale w próbce nie było IDO-1 lub IFN- γ . Wyznaczone wartości stężeń IDO-1 i IFN- γ znajdowały się poniżej LOD_{IDO-1} oraz poniżej $LOD_{IFN-\gamma}$ co oznacza, iż zastosowane ligandy nie reagują z innymi, niż docelowe analyty białkami obecnymi w próbce. W tabeli 1 zestawiono wyniki z przeprowadzonych badań.

Tabela 1.

Wyniki badań nad specyficznością opracowanej metody jednoczesnych oznaczeń IDO-1 i IFN- γ .

Oznaczenia IDO-1						
interferent	stężenie interferenta	sygnał SPRi			sygnał SPRi średni	Stężenie IDO-1 [ng/mL]
		I	II	III		
IFN- γ	5 ng/mL	1539.71	1531.35	1544.79	1538.62	0.01 (<LOD)
VEGF-A		1541.59	1536.93	1556.67	1545.06	0.02 (<LOD)
VEGF-R2		1537.2	1545.28	1540.48	1540.99	0.02 (<LOD)
FGF-2		1539.88	1538.97	1537.41	1538.75	0.01 (<LOD)
NRP-1		1531.05	1544.03	1547.76	1540.95	0.02 (<LOD)
Kat B		1544.18	1531.47	1534.76	1536.80	0.01 (<LOD)
Kat S		1546.58	1545.14	1535.12	1542.28	0.02 (<LOD)
Oznaczenia IFN-γ						
interferent	stężenie interferenta	sygnał SPRi			sygnał SPRi średni	Stężenie IFN- γ [pg/mL]
		I	II	III		
IDO-1	5 ng/mL	3240.09	3240.19	3238.08	3239.45	1.54 (<LOD)
VEGF-A		3236.85	3240.61	3239.24	3238.90	0.73 (<LOD)
VEGF-R2		3240.66	3238.8	3239.12	3239.53	1.64 (<LOD)
FGF-2		3239.65	3240.11	3237.06	3238.94	0.79 (<LOD)
NRP-1		3240.68	3237.89	3237.38	3238.65	0.36 (<LOD)
Kat B		3238.01	3241.37	3236.94	3238.77	0.54 (<LOD)
Kat S		3235.86	3240.96	3240.63	3239.15	1.09 (<LOD)

Precyzja pomiaru, dokonywanego za pomocą biosensora SPRi czułego na IDO-1 i IFN- γ , sprawdzona została poprzez 3-krotny pomiar znanych stężeń roztworów standardowych o stężeniach 0.81; 1.00; 5.00; 10.00 ng/mL dla IDO-1 oraz o stężeniach 5.29; 10.00; 1000.00; 10 000.00 pg/mL dla IFN- γ . Obliczono

współczynnik zmienności (CV)*, którego wartość dla oznaczeń IDO-1 waha się w granicach 0.36 – 6.51 %, natomiast dla oznaczeń IFN- γ mieści się w przedziale 0.07 – 4.15 %. Ponieważ we wszystkich przypadkach współczynnik ten jest mniejszy niż 25%, pomiary stężenia IDO-1 i IFN- γ za pomocą biosensora uznano za precyzyjne. W tabeli 2 zestawiono wyniki z przeprowadzonych badań.

Tabela 2.

Zestawienie wyników precyzji pomiaru IDO-1 i IFN- γ skonstruowanym biosensorem.

Oznaczenia IDO-1	Stężenie roztworu standardowego [ng/mL]			
	0.81	1	5	10
	Stężenie oznaczone [ng/mL]			
I	0.87	1.01	5.03	9.89
II	0.94	0.89	4.93	9.94
III	0.83	0.98	5.01	9.96
Średnia wartość stężenia [ng/mL]	0.88	0.96	4.99	9.93
SD [ng/mL]	0.06	0.06	0.05	0.04
<i>CV [%]</i>	<i>6.33</i>	<i>6.51</i>	<i>1.06</i>	<i>0.36</i>
Oznaczenia IFN- γ	Stężenie roztworu standardowego [pg/mL]			
	5.29	10	1000	10000
	Stężenie oznaczone [pg/mL]			
I	5.78	9.92	996.76	9998.64
II	5.69	10.46	1002.45	9985.35
III	5.34	9.79	993.32	9997.75
Średnia wartość stężenia [ng/mL]	5.60	10.06	997.51	9993.91
SD [ng/mL]	0.23	0.36	4.61	7.43
<i>CV [%]</i>	<i>4.15</i>	<i>3.53</i>	<i>0.46</i>	<i>0.07</i>

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

SD – odchylenie standardowe

C_{średnie} – średnia arytmetyczna stężenia z 3 powtórzeń pomiaru

Powtarzalność pomiaru za pomocą biosensora zbadana została poprzez 5-krotne powtórzenie pomiaru stężenia IDO-1 i IFN- γ w próbce rzeczywistej surowicy i homogenatu tkankowego. Powtarzalność określono za pomocą CV,

których wartości zestawiono w tabeli 3.

Tabela 3.

Zestawienie wartości CV dla obliczeń powtarzalności pomiarów skonstruowanym biosensorem.

IDO-1 (surowica)	Stężenie [ng/mL]	IDO-1 (homogenaty tkankowe)	Stężenie [ng/mL]
I	38.28	I	22.66
II	35.97	II	21.75
III	37.64	III	23.02
IV	39.76	IV	22.89
V	37.55	V	20.93
Średnia wartość stężenia [ng/mL]	37.84	Średnia wartość stężenia [ng/mL]	22.25
SD [ng/mL]	1.37	SD [ng/mL]	0.89
CV [%]	3.62	CV [%]	4.00
IFN-γ (surowica)	Stężenie [pg/mL]	IFN-γ (homogenaty tkankowe)	Stężenie [pg/mL]
I	190.1	I	2.40
II	188.76	II	2.23
III	195.03	III	2.51
IV	183.54	IV	2.42
V	197.37	V	2.32
Średnia wartość stężenia [pg/mL]	190.96	Średnia wartość stężenia [pg/mL]	2.38
SD [pg/mL]	5.44	SD [pg/mL]	0.11
CV [%]	2.85	CV [%]	4.46

Wartości CV wskazują na powtarzalny pomiar stężenia IDO-1 i IFN- γ w próbkach rzeczywistych, z wykorzystaniem biosensora SPRI.

Biosensor w przykładzie działania został wykorzystany do oznaczania IDO-1 i IFN- γ w serii próbek surowicy od pacjentów ze stwierdzoną białaczką i homogenatów tkankowych pacjentów ze stwierdzonym glejakiem mózgu. Przed każdym pomiarem próbki rozcieńczano buforem HBS-ES (skład buforu: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.01 % Tween-20): próbki surowicy 2-krotnie, próbki homogenatów tkankowych 5-krotnie. Na odpowiednie miejsca aktywne nanoszono tą samą uprzednio rozcieńczoną próbkę (czyli miejsce aktywne przygotowane do oznaczeń IDO-1 lub IFN- γ) o objętości 3 μ L. Próbkę

pozostawiano na 5 minut, czyli optymalny czas potrzebny do wysycenia wszystkich dostępnych ligandów analitem. Po upływie 5 minut, odsysano pozostałe na miejscach aktywnych próbki, a następnie każde z nich było 1-krotnie przemywane buforem HBS-ES. Dokonywano akwizycji danych i pomiaru sygnału SPRi, a następnie z krzywej kalibracji odczytywano wartość stężenia IDO-1 i IFN- γ po uwzględnieniu rozcieńczenia próbki. Z serii oznaczeń otrzymano wartości stężeń IDO-1 i IFN- γ , które zestawiono w tabeli 4.

Tabela 4.

Zestawienie wartości stężenia IDO-1 i IFN- γ po uwzględnieniu rozcieńczenia próbki.

Oznaczenia w surowicy		
Numer próbki	Stężenie IDO-1 [ng/mL]	Stężenie IFN-γ [pg/mL]
1	28.48	205.15
2	22.20	337.28
3	38.28	190.10
4	55.11	309.74
5	18.71	223.87
6	39.01	315.54
Oznaczenia w homogenatach tkankowych		
Numer próbki	Stężenie IDO-1 [ng/mL]	Stężenie IFN-γ [pg/mL]
1	12.85	1613.37
2	29.38	3961.87
3	30.51	2390.22
4	10.60	1439.01
5	20.98	2817.23
6	32.80	2604.62

Zastrzeżenie patentowe

Biosensor do specyficznego i jednoczesnego oznaczania 2,3-diksygenazy indolaminy IDO-1 oraz interferonu gamma IFN- γ w ludzkim materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który stanowi płytkę szklaną pokrytą warstwą złota na podłożu tytanu oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową **znamienny tym, że** warstwę receptorową stanowią biotynylowane monoklonalne królicze przeciwciała specyficzne na IDO-1 lub IFN- γ (9), zimmobilizowane na powierzchni złota (3) pokrytej hydrofobową folią o grubości 20 μm (4), tworzącą dwanaście miejsc aktywnych (5) w matrycy 4x3, przy czym przeciwciało (9) połączone jest z 50 nm warstwą złota (3), umieszczoną na 1 nm warstwie tytanu (2) pokrywającą płytkę szklaną (1), poprzez oddziaływania ze streptawidyną (8), która wiązaniem kowalencyjnym związana jest z warstwą karboksymetylodekstranu (7). za pośrednictwem linkera w postaci 3-merkapto-1-olu (6).

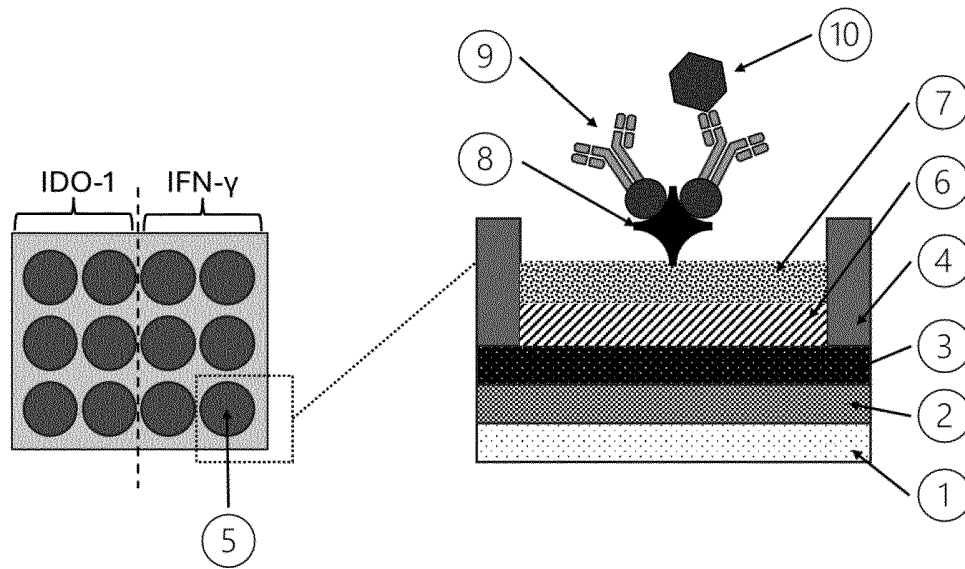


fig.1

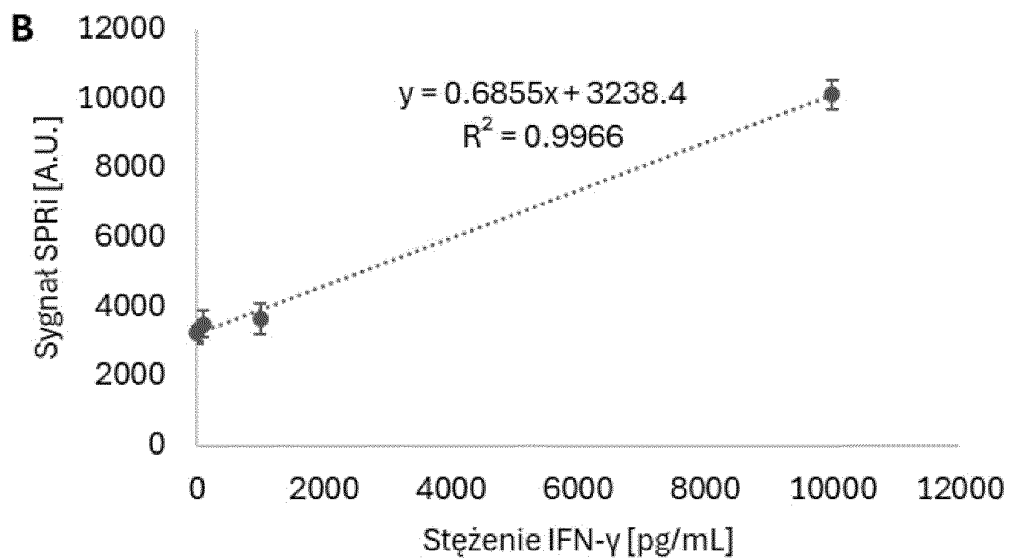
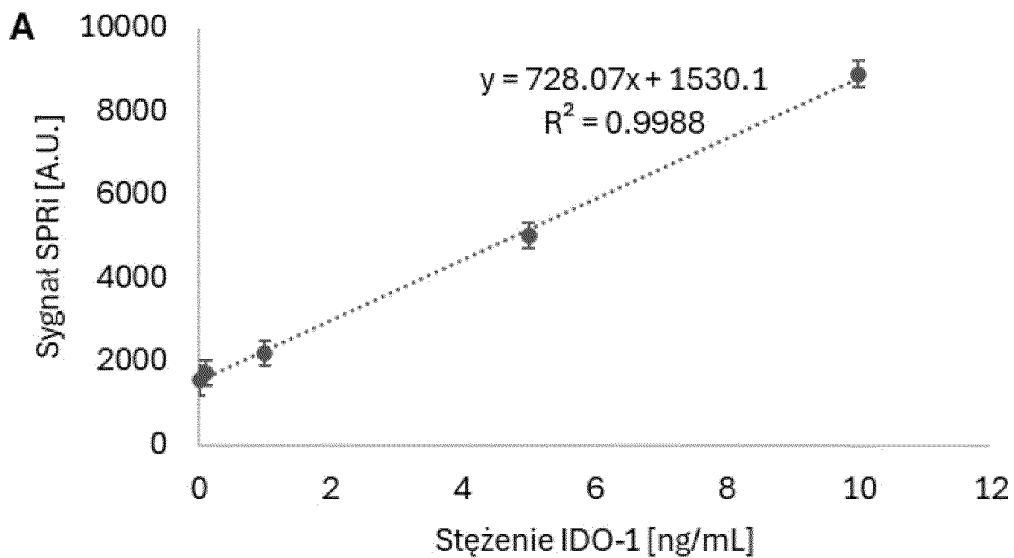
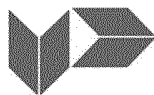


fig. 2



SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI DO ZGŁOSZENIA NR P.448841

Klasyfikacja zgłoszenia: G01N 33/543, G01N 33/68, G01N 21/55		
Podklasy w których prowadzono poszukiwania: G01N		
Bazy komputerowe w których prowadzono poszukiwania: DOCBD, WPI, NPL, bazy UPRP, Internet (Google)		
Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	KR20050058154 A; (KOREA RES INST OF BIOSCIENCE [KR]); 16-06-2005	zastrzeżenie
A	WO2005031349 A2; (SRU BIOSYSTEMS INC [US] et al.); 02-06-2005	zastrzeżenie
A	PL430495 A1; (Politechnika Poznańska); 11-01-2021	zastrzeżenie
A	PL433106 A1; (Politechnika Poznańska et al.); 06-09-2021	zastrzeżenie
<input checked="" type="checkbox"/> Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
<p>A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie, E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia, L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzeżone pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu, O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób, P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzeżona data pierwszeństwa, T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku, X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzeżony wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie, Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzeżony wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy, & – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.</p>		

Sprawozdanie wykonała:

Małgorzata Kozłowska
Ekspert Koordynator

Data:

28.10.2024

Podpis:

/podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym/
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o zastrz. z dnia 14.06.2024 r.

Kontynuacja wykazu dokumentów

Kategoria dokumentu	Dokumenty - z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	PL432021 A1; (Politechnika Poznańska et al.); 31-05-2021	zastrzeżenie
A	Chen, P. et al. Multiplex serum cytokine immunoassay using nanoplasmonic biosensor microarrays. ACS Nano. 2015; 9: 4173-81	zastrzeżenie