

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **239340**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432021**

(22) Data zgłoszenia: **29.11.2019**

(51) Int.Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 21/55 (2014.01)

(54) **Biosensor do specyficznego oznaczania stężenia ludzkiego antygenu
rakowo-płodowego CEA**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
31.05.2021 BUP 11/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.11.2021 WUP 34/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA POZNAŃSKA, Poznań, PL
UNIwersytet w Białymstoku,
Białystok, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

EWA GORODKIEWICZ, Białystok, PL
BEATA SZYMAŃSKA, Krasne Małe, PL
BOGDAN WYRWAS, Poznań, PL
ZENON ŁUKASZEWSKI, Kamionki, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Marcin Walkowiak

PL 239340 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania ludzkiego antygenu rakowo-płodowego (CEA) w płynach ustrojowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging.

Antygen rakowo-płodowy CEA jest markerem nowotworowym stosowanym do diagnozowania i prognozowania raka jelita grubego (T. Yamao, S. Kai, A. Kazami, K. Koizumi, T. Handa, N. Takemoto, M. Maruyama, *Tumor Markers CEA, CA19-9 and CA125 in Monitoring of Response to Systemic Chemotherapy in Patients with Advanced Gastric Cancer*, *Jpn J Clin Oncol*, 29 (1999)550–555.; C. Aggarwal, N. J. Meropol, C. J. Punt, N. Iannotti, B. H. Saidman, K. D. Sabbath, N. Y. Gabrail, J. Picus, M. A. Morse, E. Mitchell, *Relationship among circulating tumor cells, CEA and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer*, *Annals of Oncology*, 24(2013) 420–428; Chien-ChihChen, Shung-HaurYang, Jen-KouLin, Tzu-ChenLin, Wei-Shone Chen, Jeng-Kae Jiang, Huann-ShengWang, Shih-ChingChang, *Is it reasonable to add preoperative serum level of CEA and CA19-9 to staging for colorectal cancer?* *J Surgical Res.* 124(2005) 169–174).

CEA jest także markerem raka piersi, trzustki (Y. Yu, Q. Zhang, J. Buscaglia, C.C. Chang, Y. Liu, Z. Yang, Y. Guo, Y. Wang, K. Levon, M. Rafailovich, *Quantitative real-time detection of carcinoembryonic antigen (CEA) from pancreatic cyst fluid using 3-D surface molecular imprinting*, *Analyst*, 2016, 141, 4424–4431) a także raka dróg żółciowych (M. Jaklitsch, H. Petrowsky, *The power to predict with biomarkers: carbohydrate antigen 19-9 (CA 19-9) and carcinoembryonic antigen (CEA) serum markers in intrahepatic cholangiocarcinoma*, *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 4(2019)23).

CEA jest wysokocząsteczkową rakowo-płodową glikoproteiną o masie cząsteczkowej 180–200 kDa składającą się w około 60% z fragmentów cukrowych (P. Thomas, C. A. Toth, K. S. Saini, J. M. Jessup, G. Steele Jr. *The structure, metabolism and function of the carcinoembryonic antigen gene family*, *Biochim Biophys Acta.* 1032(1990)177–189; M. J. Duffy, *Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful?* *Clin Chem.* 47(2001)624–630).

U zdrowych ludzi CEA powstaje głównie w stadium rozwoju płodowego. Dlatego stężenie CEA w krwi zdrowych ludzi utrzymuje się na bardzo niskim poziomie (około 1–2 ng/ml (K. Konstantopoulos, S. N. Thomas, *Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells*, *Annual Rev. Biomed.* 11(2009) 177–202) z medianą 0,7 ng/ml (S. Ercan, O. Kaymaz, N. Yucel, A. Orcun, *Serum concentrations of CA 125, CA 15-3, CA 19-9 and CEA in normal pregnancy: a longitudinal study*, *Arch. Gynecol. Obstet.* 285(2012)579–584).

Jednak aż do wartości 5 ng/ml w osoczu stężenie CEA uważa się za mieszczące się w normie (S.-B. Tian, J.-C. Yu, W.-M. Kang, Z.-Q. Ma, X. Ye, Z.-J. Cao, C. Yan, *Combined Detection of CEA, CA 19-9, CA 242 and CA 50 in the Diagnosis and Prognosis of Resectable Gastric Cancer*, *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 15(2014)6295–6300.; Z. Vukobrat-Bjedic, A. Husic-Selimovic, A. Sofic, N. Bjedic, I. Ejeloglic, B. Gogov, A. Mehmedovic, *Cancer Antigens (CEA and CA 19-9) as Markers of Advanced Stage of Colorectal Carcinoma* *Med Arh.* 67(2013) 397–401).

CEA jest oznaczane za pomocą metody immunochemiluminescencyjnej, elektrochemiluminescencyjnej, immunosorpcyjnych testów ELISA (J. Wu, Z. Fu, F. Yan, H. Ju, *Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers*, *Trends in Analytical Chemistry*, 26(2007) a także elektrochemicznie za pomocą złotej elektrody modyfikowanej tiomocznikiem (W. Limbut, P. Kanatharana, B. Mattiasson, P. Asawatreratanakul, P. Thavarungkul, *A reusable capacitive immunosensor for carcinoembryonic antigen (CEA) detection using thiourea modified gold electrode*, *Anal. Chim. Acta* 561(2006)55–61) oraz wzmacnianej powierzchniowo spektroskopii Ramana SERS (H. Chon, S. Lee, S. W. Son, C. H. Oh, J. Choo, *Highly Sensitive Immunoassay of Lung Cancer Marker Carcinoembryonic Antigen Using Surface-Enhanced Raman Scattering of Hollow Gold Nanospheres*, *Anal. Chem.* 81(2009) 3029–3034).

Alternatywną możliwością oznaczania antygenu rakowo-płodowego (CEA) jest zastosowanie biosensora i techniki powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging) (SPRi). Została ona przedstawiona m.in. w pracach: A. Sankiewicz, L. Romanowicz, P. Laudanski, B. Zelazowska-Rutkowska, B. Puzan, B. Cylwik, E. Gorodkiewicz, *SPR imaging biosensor for determination of laminin-5 as a potential cancer marker in biological material*, *Anal Bioanal Chem.* 2016;408: 5269–5276; A. Sankiewicz, Z. Łukaszewski, K. Trzcanowska, E. Gorodkiewicz, *Determination of collagen type IV by Surface Plasmon Resonance Imaging using a specific biosensor*, *Anal Biochem.* 2016; 515: 40–46;

A. Sankiewicz, A. Markowska, Z. Łukaszewski, B. Puzan, E. Gorodkiewicz, *Methods for 20S Immuno-proteasome and 20S Constitutive Proteasome Determination Based on SPPI Biosensors*, *Cell Molec Bioengin.* 2017; 10: 174–185.40–46; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Gorodkiewicz, *The development of a matrix metalloproteinase-1 biosensor based on the surface plasmon resonance imaging technique*, *Anal Methods.* 8(2016) 6428–6435; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, I. Sveklo, E. Matuszczak, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz. *SPRI biosensors for quantitative determination of matrix metalloproteinase-2*, *Anal Methods.* 9(2017) 2407–2414; A. Sankiewicz, L. Romanowicz, M. Pyc, A. Hermanowicz, E. Gorodkiewicz, *SPR imaging biosensor for the quantitation of fibronectin concentration in blood samples*, *J Pharmac Biomed. Anal.* 150(2018)1–8; A. Tokarzewicz, L. Romanowicz, A. Sankiewicz, A. Hermanowicz, K. Sobolewski, E. Gorodkiewicz, *A New Analytical Method for Determination of Cathepsin L Based on the Surface Plasmon Resonance Imaging Biosensor*, *Int J Mol Sci.*20(2019)2166. Zastosowanie bioanalityczne SPRI przedstawiają m.in. publikacje: A. Sankiewicz, T. Guszcz, R. Mena-Hortelano, K. Zukowski, E. Gorodkiewicz E, *Podoplanin serum and urine concentration in transitional bladder cancer*, *Cancer Biomark.* 2016; 16: 343–350; E. Matuszczak, M. Tylicka, A. Hermanowicz, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, *Application of SPR imaging biosensor for the measurement of 20S proteasomes in blood plasma of children with thermal injury*, *Annal Clin Lab Sci.* 2016; 46: 407–411; A. Tokarzewicz, T. Guszcz, A. Onopiuk, R. Kozłowski, E. Gorodkiewicz, *Utility of cystatin C as a potential bladder tumour biomarker confirmed by surface plasmon resonance technique*, *Indian J A Med Res.* 2018; 218: 46–50; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase LI (UCHL1) in serum of children after thermal injury*, *Adv Med Sci.* 2017; 62: 83–86; A. Weremjewicz, E. Matuszczak, A. Sankiewicz, M. Tylicka, M. Komarowska, A. Tokarzewicz et al. *Matrix metalloproteinase-2 and its correlation with basal membrane components laminin-5 and collagen type IV in paediatric burn patients measured with Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) biosensors*, *Burns*, 2018; 44: 931–940; D. Toliczenko-Bernatowicz, E. Matuszczak, M. Tylicka, B. Szymańska, M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, et al. *Overexpression of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) in boys with cryptorchidism*, *Rios One*, 2018; 13: eO191806; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Sankiewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Concentration of Proteasome in the Blood Plasma of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRB*, *World J Surg.* 2018; 42: 2259–2264; E. Matuszczak, M. Tylicka, W. Debek, A. Tokarzewicz, E. Gorodkiewicz, A. Hermanowicz, *Concentration of UHCLI in the Serum of Children with Acute Appendicitis, Before and After Surgery, and Its Correlation with CRB and Prealbumin*, *J Investig Surg.* 2018; 31: 136–141; D. Toliczenko-Bernatowicz, E. Matuszczak, M. Tylicka, A. Sankiewicz, M. Komarowska, E. Gorodkiewicz, et al. *20S proteasome in the blood plasma of boys with cryptorchidism*, *J Endocrinol Investig.* 2018; 41: 1103–1106; E. Matuszczak, A. Sankiewicz, W. Debek, E. Gorodkiewicz, R. Milewski, A. Hermanowicz, *Immunoproteasome in the blood plasma of children with acute appendicitis, and its correlation with proteasome and UCHL1 measured by SPR imaging biosensors*, *Clin Exper Immun.* 2018; 191: 125–132; E. Matuszczak, M. Komarowska, M. Tylicka, W. Debek, E. Gorodkiewicz, A. Tokarzewicz, et al, *Determination of the concentration of cathepsin B by SPRI biosensor in children with appendicitis, and its correlation with proteasomes*, *Adv Clin Exp Med.* 2018; 27:1529–1534; R. Grzywa, E. Gorodkiewicz, E. Burchacka, A. Lesner, P. Laudanski, Z. Łukaszewski, M. Sienczyk, *Determination of cathepsin G in endometrial tissue using a surface plasmon resonance imaging biosensor with tailored phosphonic inhibitor*, *Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol.* 2014;182: 3842; P. Laudanski, E. Gorodkiewicz, B. Ramotowska, R. Charkiewicz, M. Kuźmicki, J. Szamatowicz, *Determination of cathepsins B, D and G concentration in eutopic proliferative endometrium of women with endometriosis by the surface plasmon resonance imaging (SPRI) technique*, *Eur J Obstetr Gynecol Reprod Biol.* 2013; 169: 80–83.

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 oznaczania stężenia substancji bioaktywnych. Takie biosensory ujawniają przykładowe opisy JP2009133844 (A), US6239255, PL223400, PL210052, PL222548, P.417435 czy też P.422096.

Dotychczas jednak nie opracowano biosensora SPRI do oznaczania CEA.

Istotą wynalazku jest biosensor do specyficznego oznaczania CEA w płynach ustrojowych (osocze lub surowica krwi, moczu) lub homogenatach tkankowych dostosowany do współpracy z techniką

powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji obrazowej (Imaging). Biosensor wykorzystuje monoklonalne myśie przeciwciała specyficzne wobec CEA jako receptora i spełnia warunki analityczne pod względem zakresu pomiarowego, specyficzności, precyzji i dokładności pomiaru. Biosensor według wynalazku zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwę receptorową tworzy wymienione wyżej przeciwciała zimmobilizowane na powierzchni złota wiązaniem kowalencyjnym za pośrednictwem linkera – cysteaminy.

Podstawowe założenie i wiedza o tym, że dane przeciwciała specyficznie wiąże CEA, stanowiło w toku prac nad wynalazkiem zaledwie punkt wyjścia do podjęcia projektu opracowania biosensora współpracującego z techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging. W czasie trwania prac badawczo-rozwojowych nad wynalazkiem konieczne było:

- znalezienie odpowiedniego linkera na podstawie wiedzy o budowie chemicznej przeciwciała;
- doświadczalne sprawdzenie czy przeciwciała immobilizuje się na powierzchni złota (mikroskop sił atomowych, lub rentgenowski mikroskop skaningowy);
- doświadczalne sprawdzenie czy zimmobilizowane przeciwciała wychwytuje skutecznie CEA;
- doświadczalne sprawdzenie czy zimmobilizowane przeciwciała wychwytuje skutecznie tylko CEA;
- optymalizację warunków działania biosensora;
- doświadczalne sprawdzenie czy wytworzony biosensor tworzy sygnał analityczny użyteczny do ilościowej analizy (zakres stężeń, liniowość sygnału analitycznego);
- zbadania precyzji i dokładności odpowiedzi analitycznej.

Mając powyższe na uwadze dobór właściwej warstwy receptorowej cechował się nieoczywistością względem prowadzonych prac eksperymentalnych.

Biosensor do specyficznego oznaczania ludzkiego antygenu rakowo-płodowego CEA w płynach ustrojowych w przykładzie realizacji został przedstawiony na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat biosensora, a fig. 2 pokazuje krzywą kalibracyjną CEA – zmienność liniową sygnału SPRI w zależności od stężenia CEA.

Biosensor w przykładzie realizacji składa się z płytki szklanej ze szkła BK7 1 pokrytej warstwą złota 3 o grubości 50 nm na podłożu chromu 2 o grubości 1 nm oraz siatki polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową. Warstwa receptorowa składa się z linkera 4 – cysteaminy (tiol) oraz monoklonalnego myśiego antyciała 5 specyficznego na CEA połączonego kowalencyjnie z linkerem. Warstwa receptorowa specyficznie wylapuje CEA 6 z badanego roztworu.

Biosensor jest specyficzny w tym sensie, że wychwytuje tylko marker CEA spośród setek innych substancji obecnych w płynach ustrojowych. Biosensor współpracujący z pomiarem SPRI zapewnia pomiary w zakresie stężeń dostosowanym do poziomu występującego w krwi i innych płynach ustrojowych. Odpowiedź biosensora jest liniowa (fig. 2), co jest istotne dla dokładnego wyznaczenia wyniku. Biosensor zapewnia dobrą precyzję i dokładność pomiaru.

Biosensor w przykładzie działania został wykorzystany do oznaczania CEA w serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzonym rakiem jelita grubego. 3 µL próbka osocza krwi jest наносzona na jedno z aktywnych miejsc biosensora. Po upływie 10 min próbka jest 6-krotnie przemywana buforem HBS-ES oraz wodą. Mierzy się sygnał SPRI. Stężenie CEA odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

Z serii próbek osocza krwi pacjentów ze stwierdzonym rakiem jelita grubego otrzymano następujące wyniki:

Próbka 1	sygnał SPRI	478,76	wynik	2,59 ng/mL
Próbka 2	sygnał SPRI	848,74	wynik	5,03 ng/mL
Próbka 3	sygnał SPRI	1272,49	wynik	7,83 ng/mL
Próbka 4	sygnał SPRI	461,73	wynik	2,48 ng/mL
Próbka 5	sygnał SPRI	2188,52	wynik	13,9 ng/mL
Próbka 6	sygnał SPRI	632,65	wynik	3,61 ng/mL
Próbka 7	sygnał SPRI	2043,05	wynik	12,9 ng/mL
Próbka 8	sygnał SPRI	591,53	wynik	3,34 ng/mL
Próbka 9	sygnał SPRI	722,84	wynik	4,21 ng/mL
Próbka 10	sygnał SPRI	1004,18	wynik	6,06 ng/mL
Próbka 11	sygnał SPRI	4966,40	wynik	25,8 ng/mL
Próbka 12	sygnał SPRI	4001,25	wynik	64,4 ng/mL

Próbka 13	sygnał SPRi	789,21	wynik	4,68 ng/mL
Próbka 14	sygnał SPRi	795,70	wynik	4,64 ng/mL

Zastrzeżenie patentowe

1. Biosensor do specyficznego oznaczania ludzkiego antygenu rakowo-płodowego CEA w płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych techniką powierzchniowego rezonansu plazmonów w wersji Imaging, który zawiera płytkę szklaną pokrytą warstwą złota na podłożu chromu oraz siatkę polimeru tworzącą pęk miejsc aktywnych zawierających warstwę receptorową, **znamienny tym**, że warstwę receptorową stanowi monoklonalne mysie przeciwciało (5) specyficzne wobec CEA połączone kowalencyjnie z linkerem (4), w postaci cysteaminy, łączącym receptor z warstwą złota (3) pokrywającą płytkę szklaną (1) na podłożu z chromu (2).

Rysunki

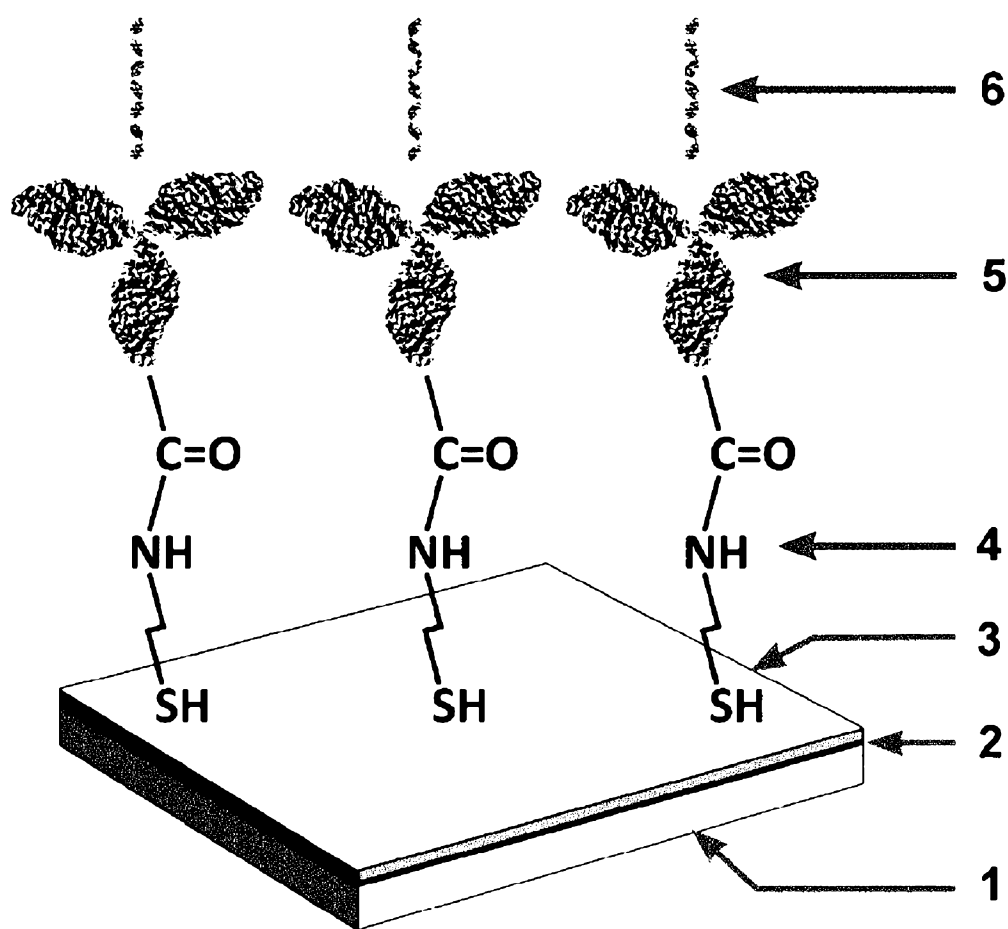


fig. 1

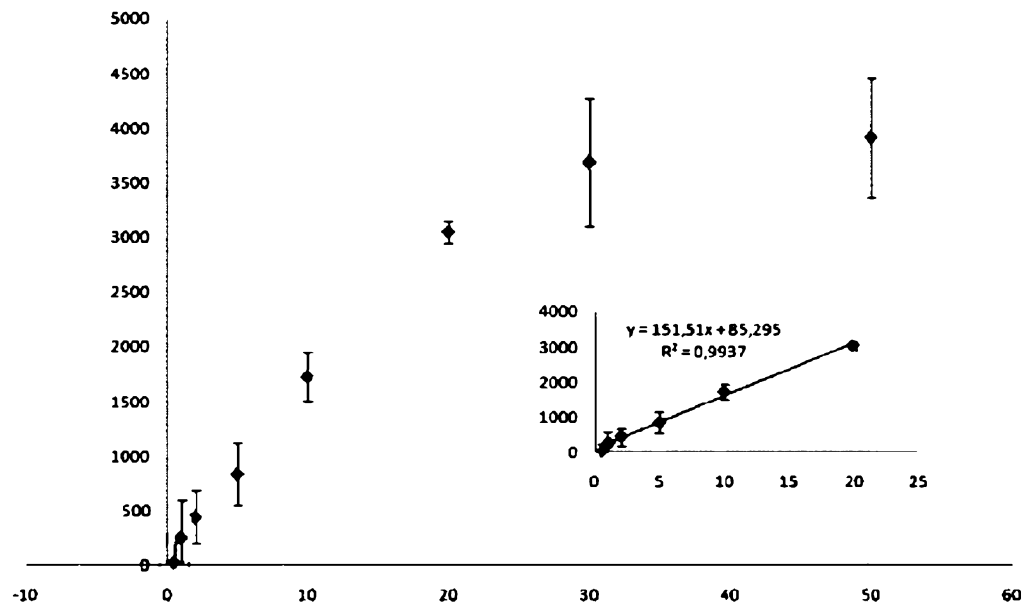


fig. 2