

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **224233**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **401828**

(22) Data zgłoszenia: **30.11.2012**

(51) Int.Cl.

C07K 16/02 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(54) **Przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec ludzkiego białka CA 15-3,
sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
10.06.2013 BUP 12/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.12.2016 WUP 12/16

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

MARCIN SIĘCZYK, Wrocław, PL

MACIEJ WALCZAK, Wrocław, PL

AGNIESZKA ŁUPICKA, Milicz, PL

RENATA GRZYWA, Wrocław, PL

KAMILA BOBREK, Łaziska Górne, PL

ANDRZEJ GAWEŁ, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 224233 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec ludzkiego białka CA 15-3, znajdujące zastosowanie w diagnostyce chorób nowotworowych w szczególności nowotworu piersi, sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie.

Mucyna 1 (CD227) jest heterodimeryczną błonową glikoproteiną o bardzo bogato O-glikozylowanej domenie zewnątrzkomórkowej. Charakteryzuje ją znaczny polimorfizm, ale również różny poziom glikozylacji (50–90% masy molowej) ze względu na rodzaj komórek ekspresjonujących białko, a także ich stan fizjologiczny. Stąd długość sekwencji mucyny 1 może wahać się od 1255 do ponad 2000 aminokwasów a jej masa może sięgać ok. 500 kDa. Występuje ona na powierzchni komórek nabłonka wielu organów (m.in. płuc, żołądka, jelita, jajnika i in.), stanowiąc barierę ochronną komórek przed patogenami. Nadekspresja mucyny 1 związana jest z rozwojem chorób nowotworowych, głównie nowotworu piersi, ale także jajnika, płuc, jelita grubego czy trzustki. Podwyższona ilość mucyny 1 na powierzchni komórek nowotworowych utrudnia wnikanie chemoterapeutyków, chroni komórkę przez mechanizmami programowanej śmierci a także ma wpływ na inwazyjność nowotworu [Singh R, Bandyopadhyay D. *MUC1: a target molecule for cancer therapy*. *Cancer Biol Ther*. 2007, 6, 481–6; Gendler SJ. *MUC1, the renaissance molecule*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*., 2001, 6, 339–53]. Dodatkowo może zachodzić uwalnianie domeny zewnątrzkomórkowej mucyny 1 z błony przez autokatalityczną hydrolizę w obrębie domeny SEM [Macao B, Johansson DG, Hansson GC, Härd T. *Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin*. *Nat Struct Mol Biol* 2006, 13, 71–6]. U osób chorych wraz z pojawieniem się nadekspresji mucyny 1 często obserwuje się podwyższoną ilość jej rozpuszczalnej formy określanej często, jako CA 15-3. Obecne w surowicy a także w ślinie białko stanowi marker nowotworowy, będący najczęściej wykorzystywanym (obok markera CA 27.29) markerem w diagnostyce nowotworu piersi, głównie do monitorowania postępów leczenia. Badania immunochemiczne oparte na wykrywaniu markerów nowotworowych są rutynowo stosowane w diagnostyce nowotworu piersi obok badań histologicznych oraz badań obrazowych.

Opisane w literaturze naukowej oraz dostępne handlowo do celów diagnostycznych przeciwciała (tak mono- jak i poliklonalne) specyficzne wobec kompletnego ludzkiego białka CA 15-3 należą do klasy IgG i pochodzą z organizmów myszy, królika oraz chomika.

Jedynymi handlowo dostępnymi przeciwciałami klasy IgY są poliklonalne przeciwciała otrzymane dla fragmentów białka CA 15-3: które odpowiadają rejonowi pomiędzy 199 a 244 aminokwasem [produkt firmy Novus Biologicals], 197 a 252 aminokwasem [produkt firmy Abcam] oraz dla fragmentu otrzymanego dla aminokwasów z rejonu od reszty 1181 do 1226 [produkt firmy GenWay Biotech].

W organizmach płazów, gadów i ptaków obecne są przeciwciała klasy IgY pełniące funkcje obronne układu odpornościowego (humoralnej odpowiedzi układu odpornościowego). Przeciwciała IgY są ewolucyjnym przodkiem ssaczych przeciwciał klas IgG oraz IgE. Z uwagi na spełniane funkcje przeciwciała IgY najbardziej zbliżone są do przeciwciał IgG ssaków, natomiast strukturalnie przypominają przeciwciała klasy IgE. Występują one we krwi ptaków lecz dodatkowo transportowane są w dużych ilościach (około 100–150 mg) z krwi do żółtka jaja. Magazynowanie przeciwciał IgY w żółtku jaja stanowi swoisty mechanizm pasywnej ochrony młodych piskląt przed patogenami. Stanowi to zaletę przy produkcji specyficznych przeciwciał IgY, dzięki czemu możliwe jest pozyskanie w krótkim czasie dużych ilości przeciwciał do zastosowań diagnostycznych lub terapeutycznych. Technologię opartą na przeciwciałach IgY charakteryzuje szereg zalet – nie wymaga skrwawiania zwierząt w celu pozyskania przeciwciał; wysoka odpowiedź na podany antygen utrzymuje się do końca życia zwierzęcia; ze względu na dużą odległość filogenetyczną między ssakami a ptakami możliwe jest otrzymanie specyficznych przeciwciał skierowanych wobec konserwatywnych białek ssaków. Dodatkowe atuty stanowią stosunkową łatwość izolacji, a także ilość przeciwciał, jaką można uzyskać z jednego jaja co sprawia, iż immunoglobuliny Y są coraz częściej wykorzystywane. Analiza biochemiczna i funkcjonalna przeciwciał klasy IgY wykazała wiele zalet ich stosowania w diagnostyce chorób. W przeciwieństwie do ssaczych przeciwciał klasy IgG przeciwciała kurze nie aktywują ludzkiego systemu dopełniacza, nie reagują z ludzkim czynnikiem reumatoidalnym czy przeciwciałami HAMA co prowadzi do znacznego zmniejszenia fałszywie pozytywnych wyników uzyskiwanych w testach serologicznych.

Dotychczas nie opisano w literaturze przeciwciał IgY specyficznych wobec kompletnego ludzkiego białka CA 15-3.

Istotą wynalazku są przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec białka CA 15-3 są izolowane z żółtka jaj drobiu immunizowanego białkowym antygenem w postaci białka CA 15-3 izolowanego z ludzkiej linii komórek BTA o sekwencji przedstawionej wzorem 1.

Korzystnie przeciwciała mają masę cząsteczkową od 175000 do 200000 daltonów.

Sposób wytwarzania przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec białka CA 15-3 polega na tym, że drób, korzystnie kury ras hodowlanych, poddaje się immunizacji antygenem w postaci białka CA 15-3 izolowanego z ludzkiej linii komórek BTA o sekwencji przedstawionej wzorem 1, przy czym immunizację prowadzi się w trzech osobnych dawkach, a jako adiuwantu używa się pełnego adiuwantu Freund'a, po czym znaną metodą izoluje się przeciwciała z wydajnością 80–150 mg/jajko i czystością 85–95%.

Zastosowanie przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec białka CA 15-3 do wytwarzania testu diagnostycznego do detekcji antygenów nowotworowych – białka CA 15-3.

Wyizolowane przeciwciała poddaje się analizie biochemicznej w celu określenia ich czystości, miana przeciwciał, specyficzności antygenowej, awidności i stężenia. W trakcie procesu immunizacji analizę przeciwciał przeprowadzono dla każdego pobranego jaja w okresie 20 tygodni. Odpowiedź organizmu w postaci produkcji specyficznych przeciwciał IgY pojawiła się po 4 tygodniu od momentu pierwszej immunizacji.

Sposób według wynalazku cechuje duża ilość izolowanych przeciwciał oraz niska inwazyjność, ponieważ nie wymaga skrwawiania zwierząt w określonych odstępach czasu w celu izolacji przeciwciał.

Przeciwciała według wynalazku mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce chorób nowotworowych w szczególności nowotworów piersi, płuc, jajnika, trzustki oraz jelita grubego. Wykorzystanie otrzymanych przeciwciał anti-CA 15-3 IgY w diagnostyce polega na ich zdolności do specyficznego wiązania z docelowym antygenem. Dzięki związaniu przeciwciał IgY do antygeny możliwa jest pośrednia detekcja białka CA 15-3 przy użyciu handlowo dostępnych drugorzędowych przeciwciał anti-IgY (np. królicze przeciwciała IgG anti-IgY) zawierających dowolny znacznik (peroksydaza chrzastowa, fosfataza alkaliczna, biotyna, fluoresceina).

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach oraz na rysunku na którym:

Fig. 1 przedstawia analizę elektroforetyczną (SDS-PAGE, 4–12%) w warunkach nieredukujących otrzymanych przeciwciał IgY specyficznych wobec białka CA 15-3. Barwienie wykonano przy użyciu barwnika Coomassie R 250.

Fig. 2 przedstawia wykres przedstawiający odpowiedź w postaci produkcji specyficznych wobec białka CA 15-3 przeciwciał IgY. Strzałkami oznaczono czas immunizacji. Abs* – przedstawione wartości absorbancji po odjęciu wartości absorbancji otrzymanych dla kontrolnych przeciwciał IgY.

Fig. 3 przedstawia detekcję białka CA 15-3 przez otrzymane specyficzne przeciwciała IgY (western blotting).

Fig. 4 przedstawia wykres przedstawiający zdolność przeciwciał IgY do wykrywania białka CA 15-3.

Fig. 5 przedstawia wykres mianowania przeciwciał IgY do detekcji białka CA 15-3.

Fig. 6 przedstawia reaktywność specyficznych przeciwciał anti-CA 15-3 IgY względem białka CA 15-3 oraz albuminy wołowej (BSA) wraz z awidnością.

Fig. 7 przedstawia zdolność detekcji natywnej i zdenaturowanej formy białka CA 15-3 przez przeciwciała IgY.

Fig. 8 przedstawia wykres przedstawiający awidność otrzymanych przeciwciał anti-CA 15-3 w czasie immunizacji. Abs* – przedstawione wartości absorbancji po odjęciu wartości absorbancji otrzymanych dla kontrolnych przeciwciał IgY.

Fig. 9 przedstawia zdolność detekcji białka CA 15-3 przez otrzymane specyficzne przeciwciała IgY (western blotting).

Fig. 10 przedstawia detekcję białka CA 15-3 przez specyficzne przeciwciała IgY (western blotting).

Fig. 11 przedstawia detekcję białka CA 15-3 na powierzchni komórek MCF 7 przez znakowane fluorescencyjnie przeciwciała anti-CA 15-3 IgY.

P r z y k ł a d 1

1.1 Przygotowanie antygeny do immunizacji

Ludzkie białko CA 15-3 (izolowanego z ludzkiej linii komórek BTA o sekwencji przedstawionej wzorem 1) rozpuszcza się tuż przed wykonaniem iniekcji w mieszaninie sterylnego roztworu soli fizjologicznej i pełnego adiuwantu Freund'a w stosunku 1:1 (v/v).

1.2 Immunizacja zwierząt

Kury hodowlane, rasy *White Leghorn* immunizuje się przez podanie domięśniowe antygeny, w ilości 100 µg/zwierzę (300 µl). Immunizację powtarza się następnie po 4 i 8 tygodniach stosując antygen, w ilości 50 µg na zwierzę. Grupa kontrolna otrzymuje iniekcję roztworu soli fizjologicznej, zawierającej jedynie pełny adiuwant Freund'a (1:1, v/v, 300 µl/zwierzę).

1.3 Pobieranie i przechowywanie materiału biologicznego

Jaja kolekcjonuje się codziennie poczynając od następnego dnia po immunizacji przez 20 tygodni i przechowuje w temperaturze 4°C do czasu izolacji przeciwciał.

1.4 Izolacja przeciwciał IgY

Jaja przemywa się 50% roztworem izopropanolu, a następnie rozdziela żółtko od białka. Po usunięciu błony białkowej otaczającej worek żółtkowy, płynną zawartość rozcieńcza się pięciokrotnie buforem fosforanowym (PBS, 10 mM, pH 7,4) z 4,75% dodatkiem glikolu polietylenowego 6000 (PEG 6000), aby zapewnić końcowe stężenie PEG 6000 3,5%. Po dokładnym wymieszaniu całość wiruje się przy 11 000 rpm przez 15 min w 4°C a otrzymany supernatant filtruje przez sączek bibułowy. Do supernatantu dodaje się następnie PEG 6000 do końcowego stężenia 12%. Po dokładnym wymieszaniu wytrącony osad odwirowuje się (11 000 rpm przez 15 min w 4°C). Supernatant odrzuca się, a osad zawierający przeciwciała klasy IgY rozpuszcza dokładnie w buforze fosforanowym (pH 7,4) w objętości 10 ml i dodaje PEG 6000 do końcowego stężenia 12%. Wytrącony osad zawierający czyste przeciwciała IgY, po odwirowaniu i odrzuceniu supernatantu, rozpuszcza się w 5 ml buforu PBS. Po wykonaniu analiz biochemicznych roztwory przeciwciał przechowuje się w temperaturze -20°C. Stężenie otrzymanych białek określa się spektrofotometrycznie (A_{280}). Czystość wyizolowanych przeciwciał zawiera się w zakresie 85–95% (fig. 1).

Przykład 2

Analiza odpowiedzi immunologicznej na podany antygen CA 15-3 w czasie procesu immunizacji

Do analizy odpowiedzi immunologicznej immunizowanych zwierząt i określenia miana produkowanych przeciwciał zastosowano test ELISA. Płytki mikrotitracyjne 96-cio dołkowe pokryto antygenem CA 15-3 (50 ng/100 µL) rozpuszczonym w buforze węglanowym (50 mM, pH 9,6) i inkubowano w temperaturze 4°C przez 12 godzin. Wolne miejsca zablokowano następnie przy użyciu 10% roztworu mleka odtłuszczonego w buforze fosforanowym w temperaturze 37°C w czasie 120 minut. Po odmyciu czynnika blokującego specyficzne oraz kontrolne przeciwciała rozcieńczone (1:100) w 0,5% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze fosforanowym zawierającym 0,05% (v/v) Tween-20 (10 mM, pH 7,4) naniesiono na opłaszczoną antygenem płytkę mikrotitracyjną i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C. Detekcję kompleksów białko CA 15-3-przeciwciała IgY wykonano przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY sprzężonego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylo-diaminy, jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplatek. Dla każdego tygodnia procesu immunizacji pomiar przeprowadzony został dla czterech izolatów przeciwciał anti-CA 15-3 IgY (fig. 2).

Przykład 3

Analiza specyficzności przeciwciał IgY anti-CA 15-3 w teście western blotting w czasie procesu immunizacji

W celu potwierdzenia specyficzności otrzymanych przeciwciał specyficznych wobec białka CA 15-3 wykonano analizę western blotting. Po rozdziale elektroforetycznym w warunkach nieredukujących (SDS PAGE, 4–12%) białka CA 15-3 (200 ng białka na studzienkę) przeprowadzono elektrotransfer na membranę nitrocelulozową. Blokowanie wolnych miejsc wiążących na membranie nitrocelulozowej wykonano przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w buforze fosforanowym zawierającym 0,05% Tween-20 (v/v) przez 12h w temperaturze 4°C. Następnie przeciwciała specyficzne wobec białka CA 15-3 oraz kontrolne rozcieńczono (1:100) w 0,5% roztworze mleka odtłuszczonego w buforze fosforanowym zawierającym 0,05% Tween-20 (v/v) i inkubowano z membraną w czasie 1 h w temperaturze 37°C. Po wypłukaniu membrany buforem PBST detekcję związanych z antygenem specyficznych przeciwciał przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY sprzężonego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD.

Przykład 4

Limit detekcji białka CA 15-3 w teście ELISA

W celu określenia limitu detekcji białka CA 15-3 przez otrzymane specyficzne przeciwciała IgY wykorzystano enzymatyczny test immunosorpcyjny fazy stałej (ELISA) w sposób opisany powyżej.

W tym celu 96-cio dołkową płytkę mikrotitracyjną opłaszczono białkiem CA 15-3 w różnych stężeniach w przedziale od 1000 ng/ml do 2,5 ng/ml (100 µl/studzienkę). Następnie inkubowano z roztworem specyficznego wobec białka CA 15-3 przeciwciała rozcieńczonego 500-krotnie 0,5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze fosforanowym zawierającym 0,05% (v/v) Tween-20. Detekcję kompleksów CA 15-3-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylodiaminy, jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplatek. Jako kontroli użyto przeciwciała z grupy kontrolnej w analogicznych rozcieńczeniach. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 4).

Przykład 5

Miano przeciwciał – test ELISA

Miano otrzymanych przeciwciał specyficznych wobec antygeny CA 15-3 określono przy użyciu testu ELISA. Płytkę opłaszczono białkiem CA 15-3 w ilości 25 ng/studzienkę. Przygotowano następnie serię rozcieńczeń specyficznych oraz kontrolnych przeciwciał IgY w zakresie od 1:100 do 1:100000 i inkubowano z opłaszczoną antygenem płytką. Detekcję kompleksów CA 15-3-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylodiaminy, jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplatek. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 5).

Przykład 6

Reaktywność przeciwciał anti-CA 15-3 IgY z BSA

Reaktywność z albuminą wołową (BSA) otrzymanych przeciwciał specyficznych wobec antygen CA 15-3 wraz z ich awidnością określono przy użyciu testu ELISA. Płytkę opłaszczono antygenem (białkiem CA 15-3 lub albuminą wołową) w ilości 50 ng/studzienkę. Przygotowano następnie serię rozcieńczeń przeciwciał IgY (specyficznych wobec białka CA 15-3 oraz przeciwciał kontrolnych) w zakresie od 1:100 do 1:1000 i inkubowano z opłaszczoną antygenami płytką mikrotitracyjną. Dla każdego z badanych punktów pomiarowych dwa powtórzenia inkubowano następnie z PBST podczas gdy dwa kolejne z 6M mocznikiem w PBST przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Detekcję kompleksów CA 15-3-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplatek. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 6). Przeciwciała kontrolne wykazały brak reaktywności z białkiem CA 15-3 oraz przeciwciała specyficzne wobec białka CA 15-3 nie wykazywały reaktywności z albuminą wołową.

Przykład 7

Określenie zdolności przeciwciał IgY do detekcji zdenaturowanego białka CA 15-3

W celu określenia zdolności otrzymanych przeciwciał anti-CA 15-3 do detekcji zdenaturowanego białka CA 15-3 wykorzystano test ELISA. W tym celu studzienki płytki mikrotitracyjnej opłaszczono natywnym białkiem CA 15-3 (kontrola) oraz białkiem CA 15-3 poddanym wcześniejszej denaturacji termicznej (białko zagotowano przez 10 minut w temperaturze 100°C) w ilości 50 ng/studzienkę. Po inkubacji (12h, 4°C) i zablokowaniu wolnych miejsc (10% mleko w buforze PBS) inkubowano z roztworem specyficznego wobec białka CA 15-3 przeciwciała IgY lub przeciwciała kontrolnego (1:100). Detekcję kompleksów CA 15-3-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplatek. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 7).

Przykład 8

Awidność przeciwciał anti-CA 15-3 – ELISA

W celu określenia awidności otrzymanych przeciwciał anti-CA 15-3 wykorzystano test ELISA. W tym celu studzienki płytki mikrotitracyjnej opłaszczono natywnym białkiem CA 15-3 w ilości 50 ng/studzienkę. Po inkubacji (12h, 4°C) i zablokowaniu wolnych miejsc (10% mleko w buforze PBS) inkubowano z roztworami specyficznych wobec białka CA 15-3 przeciwciał IgY lub przeciwciała kontrolnego (1:100). Po wypłukaniu płytki mikrotitracyjnej studzienki dla każdego z badanych przeciwciał inkubowano z 6M roztworem mocznika lub PBST przez 10 min. w temperaturze pokojowej. Detekcję kompleksów CA 15-3-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylodiaminy jako chromogenicznego substratu.

Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplitek. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 8).

Przykład 9

Limit detekcji białka CA 15-3 – western blotting

W celu określenia limitu detekcji białka CA 15-3 w technice western blotting w pierwszym etapie wykonano rozdział elektroforetyczny (SDS PAGE, 4–12%) białka CA 15-3 w warunkach nieredukujących w ilości mieszczącej się w zakresie od 200 ng do 0,1 ng/studzienkę a następnie transfer białek na membranę nitrocelulozową. Po zablokowaniu wolnych miejsc wiążących przy użyciu 5% roztworu mleka odtłuszczonego w buforze PBST membranę inkubowano z roztworem otrzymanego specyficznego wobec białka CA 15-3 przeciwciała IgY (1:100, 0,5% mleko/PBST). Detekcję kompleksów CA 15-3-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anty-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD (fig. 9).

Przykład 10

Miano przeciwciał – western blotting

W celu określenia zakresu stężeń otrzymanych specyficznych przeciwciał klasy IgY w technice western blotting niezbędnego do detekcji białka CA 15-3 wykonano analizę techniką western blotting (86 ng białka CA 15-3/studzienkę). Po transferze białek na membranę nitrocelulozową i blokowaniu wolnych miejsc paski membrany inkubowano z roztworami specyficznego wobec białka CA 15-3 przeciwciała IgY rozcieńczonego w zakresie od 1:100 do 1:25000. Po wypłukaniu pasków membrany buforem PBST detekcję związanych z antygenem specyficznych przeciwciał przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anty-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD (fig. 10).

Przykład 11

Otrzymywanie specyficznych przeciwciał anty-CA 15-3 znakowanych fluoresceiną

W celu wyznakowania przeciwciał IgY fluorescencyjnym znacznikiem w postaci fluoresceiny przygotowano 1 ml roztworu specyficznych względem CA 15-3 przeciwciał IgY o stężeniu 1 mg/ml w buforze fosforanowym (pH 7.4). Do roztworu dodano 0,4 mg NHS-fluoresceiny rozpuszczonej wcześniej w 0,1 ml DMF a następnie ustalono pH otrzymanej mieszaniny na poziomie 7–9 przy pomocy DIPEA. Reakcję prowadzono 2h, chroniąc mieszaninę od światła a następnie frakcję białkową oczyszczono stosując chromatografię żelową.

Ocenę zdolności wiązania znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał IgY specyficznych względem białka CA 15-3 przeprowadzono z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Analizowanym preparatem były komórki ludzkiej linii nowotworu piersi MCF 7, immobilizowane do podłoża metodą EDC/NHS (Louise Meyer R, Zhou X, Tang L, Arpanaei A, Kingshott P, Besenbacher F., Ultramicroscopy 2010, 110, 1349) (fig. 11).

Zastrzeżenia patentowe

1. Przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec białka CA 15-3 izolowane z żółtka jaj drobiu immunizowanego białkowym antygenem w postaci białka CA 15-3 izolowanego z ludzkiej linii komórek BTA o sekwencji przedstawionej wzorem 1.

2. Przeciwciała według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że mają masę cząsteczkową od 175000 do 200000 daltonów.

3. Sposób wytwarzania przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec białka CA 15-3, **znamienny tym**, że immunizuje się drób antygenem w postaci białka CA 15-3 izolowanego z ludzkiej linii komórek BTA o sekwencji przedstawionej wzorem 1, przy czym immunizację prowadzi się w trzech osobnych dawkach, a jako adiuwantu używa się pełnego adiuwantu Freund'a, po czym znana metodą izoluje się przeciwciała z wydajnością 80–150 mg/jajko i czystością 85-95%.

4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że immunizuje się kury ras hodowlanych.

5. Zastosowanie przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec białka CA 15-3 do wytwarzania testu diagnostycznego do detekcji antygeny nowotworowego – białka CA 15-3 *in vitro*.

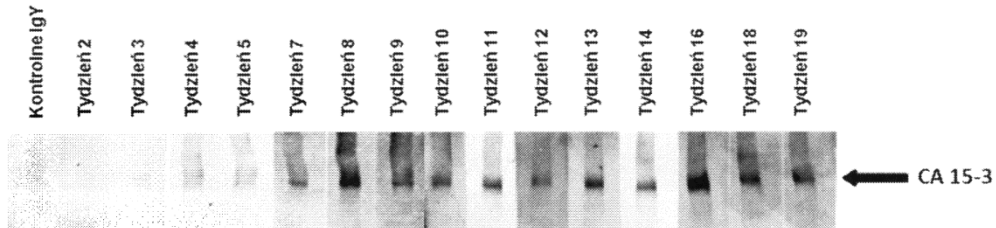


fig. 3

Limit detekcji białka CA 15.3 przez specyficzne przeciwciała IgY

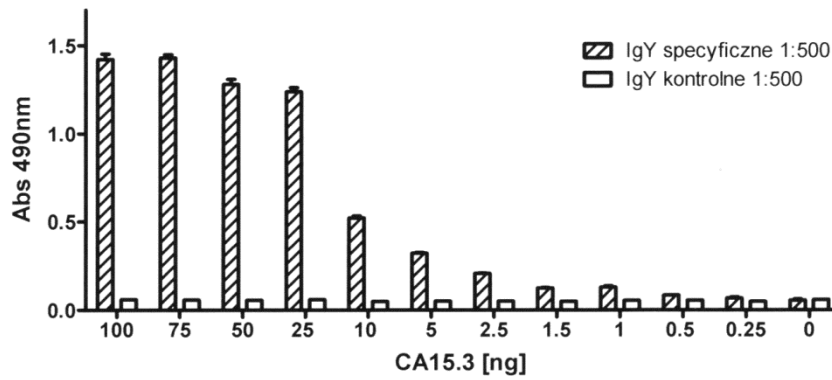


fig. 4

Miano przeciwciał anty - CA 15.3 IgY

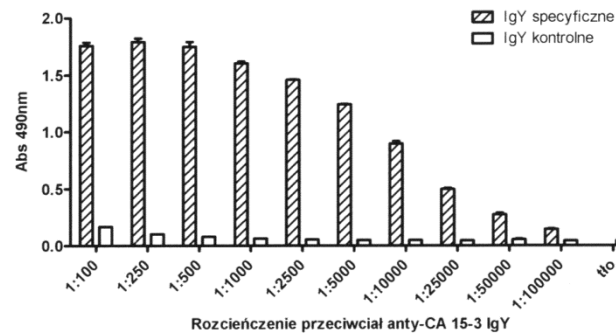


Fig .5

Reaktywność specyficznych przeciwciał IgY wobec CA 15-3 oraz albuminy wołowej wraz z awidnością

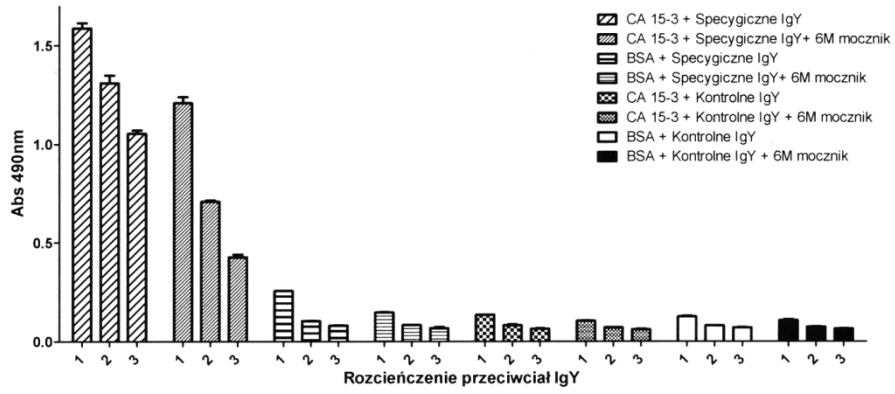


Fig. 6

Detekcja natywnego i zdenaturowanego białka CA 15-3 przez otrzymane przeciwciała IgY



Fig. 7

Awidność przeciwciał anti-CA 15-3 IgY

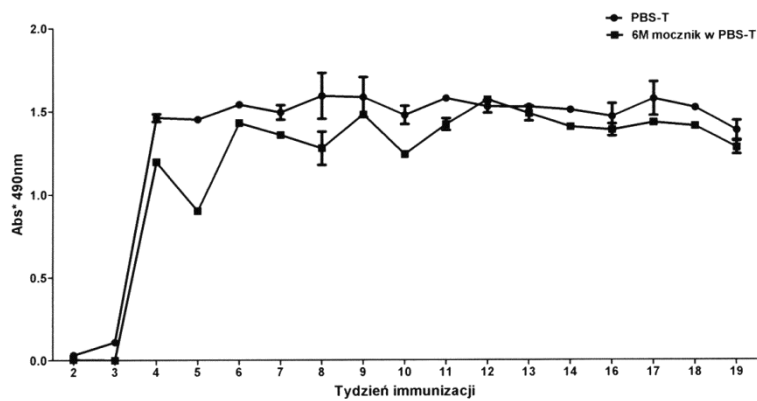


Fig. 8

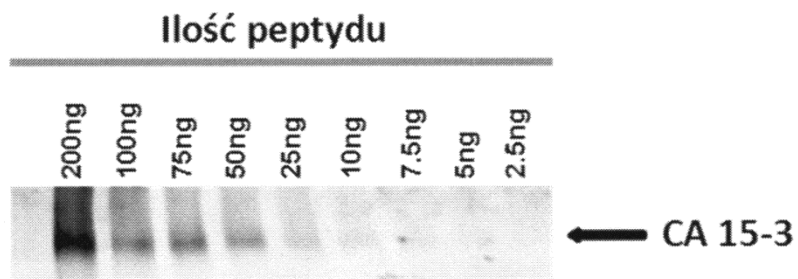


Fig.9

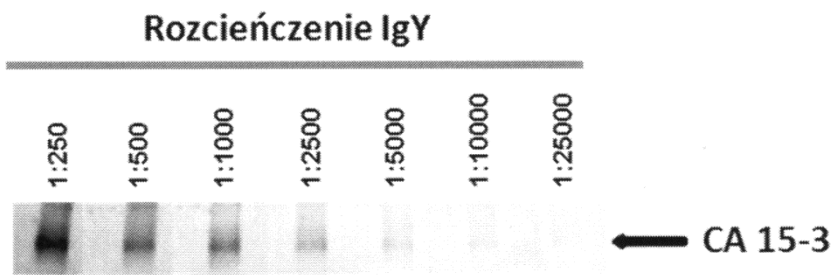


Fig.10

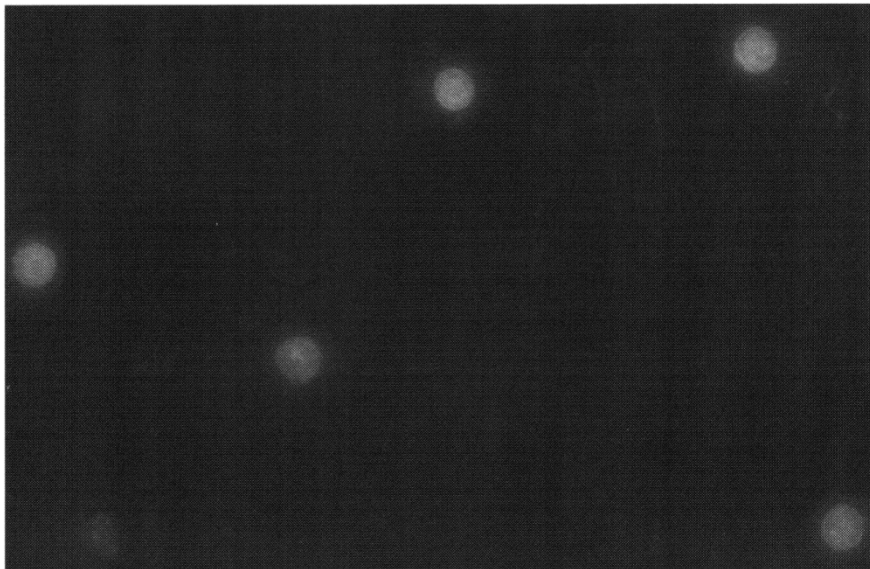


Fig.11