

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **224244**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **402795**

(22) Data zgłoszenia: **15.02.2013**

(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 epitopu
ludzkiego białka CA 15-3(1066-1085), sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

02.09.2013 BUP 18/13

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.12.2016 WUP 12/16

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

RENATA GRZYWA, Wrocław, PL
AGNIESZKA ŁUPICKA, Milicz, PL
MACIEJ WALCZAK, Wrocław, PL
KAMILA BOBREK, Łaziska Górne, PL
MAGDALENA IDZI, Domaszowice, PL
MARIA ŁĘCKA, Wrocław, PL
ANDRZEJ GAWEŁ, Wrocław, PL
STEPHANE BOIVIN, Hamburg, DE
MARCIN SIĘCZYK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 224244 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec epitopu ludzkiego białka CA 15-3(1085-1103) znajdujące zastosowanie w diagnostyce chorób nowotworowych, w szczególności nowotworu piersi. Przedmiotem wynalazku jest również sposób ich wytwarzania oraz ich zastosowanie.

Białko CA 15-3 stanowi marker nowotworowy pojawiający się w surowicy, a także ślinie osób cierpiących na choroby nowotworowe, w szczególności nowotwór piersi, płuc, trzustki, jajnika czy jelita grubego. Białko CA 15-3 stanowi rozpuszczalną formę białka błonowego - mucyny 1, która powstaje w wyniku odcięcia domeny zewnątrzkomórkowej tego białka. Mucyna 1 (CD227) jest heterodimerską glikoproteiną błonową charakteryzującą się bogato O-glikozylowaną domeną zewnątrzkomórkową. Glikozylacja mucyny 1 może stanowić 50–90% jej całkowitej masy cząsteczkowej, przez co masa molowa tego białka może sięgać nawet 500 kDa, a rozmiar domeny zewnątrzkomórkowej może osiągać długość 500 nm. Mucyna 1 występuje na powierzchni komórek nabłonkowych stanowiąc barierę chroniącą komórki przed patogenami. Jej obecność stwierdzono na powierzchni komórek nabłonkowych takich organów jak płuca, żołądek, jelita czy jajnik. W przypadku tkanki nowotworowej podwyższona ilość mucyny 1 na powierzchni komórek utrudnia wnikanie chemoterapeutyków, a dodatkowo uczestniczy w zahamowaniu mechanizmów programowanej śmierci komórki (domena cytoplazmatyczna uczestniczy w anty-apoptotycznej kaskadzie *ras*), a także zwiększa 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, 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].

Diagnostyka chorób nowotworowych, w szczególności nowotworu piersi opiera się na metodach badań histologicznych oraz obrazowych, głównie radiologicznych – mammografia. Metody immunochemiczne oparte o detekcję markerów nowotworowych, które stosuje się w diagnostyce nowotworu piersi, najczęściej skierowane są na wykrywanie obecności dwóch markerów: białka CA 15-3 oraz białka CA 27.29. Obecnie diagnostyka oparta o detekcję markera CA 15-3 wykorzystywana jest głównie do monitorowania postępów terapii.

Większość opisanych w literaturze naukowej oraz dostępnych handlowo do celów diagnostycznych przeciwciał (tak mono- jak i poliklonalnych) specyficznych wobec kompletnego ludzkiego białka CA 15-3, jak i jego fragmentów, należy do klasy IgG i pochodzi z organizmów ssaków m.in. myszy, królika oraz chomika.

Jedynie dostępne przeciwciała klasy IgY specyficzne wobec epitopów białka CA 15-3 stanowią poliklonalne przeciwciała otrzymane dla fragmentów: pomiędzy 199 a 244 aminokwasem [produkt firmy Novus Biologicals], 197 a 252 aminokwasem [produkt firmy Abcam] oraz dla aminokwasów z rejonu od reszty 1181 do 1226 [produkt firmy GenWay Biotech].

Przeciwciała klasy IgY występują w organizmach płazów, gadów i ptaków gdzie stanowią istotny element humoralnej odpowiedzi układu odpornościowego. Ewolucyjnie są przodkiem przeciwciał klasy IgG oraz IgE u ssaków. Funkcjonalnie przeciwciała IgY są odpowiednikami przeciwciał IgG ssaków, natomiast strukturalnie bardziej zbliżone są do przeciwciał klasy IgE. Przeciwciała IgY obecne są we krwi ptaków oraz dodatkowo duże ich ilości około 100–150 mg przenoszone są do żółtka jaja, gdzie zapewniają pasywną ochronę piskląt przed patogenami. Z uwagi na obecność dużych ilości przeciwciał IgY w żółtku jaj możliwe jest pozyskanie dużych ilości przeciwciał w krótkim czasie bez konieczności skrwawiania zwierząt, co stanowi zaletę przy ich produkcji. Dodatkowym atutem immunizacji ptaków w celu otrzymywania przeciwciał IgY jest fakt, iż odpowiedź w postaci produkcji specyficznych przeciwciał utrzymuje się do końca życia zwierząt. Technologia oparta na przeciwciałach IgY pozwala także na otrzymywanie specyficznych przeciwciał skierowanych wobec konserwatywnych białek ssaków, co jest możliwe ze względu na dużą odległość filogenetyczną między ptakami a ssakami. Ponadto w przeciwieństwie do ssaczy przeciwciał klasy IgG przeciwciała kurze nie aktywują ludzkiego systemu dopełniacza oraz 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 fragmentu ludzkiego białka CA 15-3 odpowiadającego resztom 1066–1085.

Istotą wynalazku są przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) izolowane z żółtka jaj drobiu immunizowanego białkowym antygenem w postaci koniugatu CA 15-3(1066-1085)-KLH o sekwencji peptydu przedstawionej wzorem 1.

Korzystnie przeciwciała mają masę cząsteczkową od 175000 do 200000 daltonów.

Sposób wytwarzania przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) polega na tym, że drób, korzystnie kury ras hodowlanych, poddaje się immunizacji białkowym antygenem w postaci koniugatu CA 15-3(1066-1085)-KLH o sekwencji peptydu 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 epitopu białka CA 15-3(1066-1085) do wytwarzania testu diagnostycznego do detekcji 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 w 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(1066-1085) IgY w diagnostyce polega na ich zdolności do rozpoznawania specyficznego fragmentu polipeptydowego, który stanowi fragment białka CA 15-3. 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 chrzanowa, 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 epitopu białka CA 15-3(1066-1085). Barwienie wykonano przy użyciu barwnika Coomassie R 250.

Fig. 2 przedstawia wykres przedstawiający odpowiedź w postaci produkcji specyficznych wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) przeciwciał IgY. Strzałkami oznaczono czas immunizacji. Abs* - przedstawione wartości absorbancji po odjęciu wartości absorbancji otrzymanych dla kontrolnych przeciwciał IgY.

Fig. 3 przedstawia detekcję epitopu białka CA 15-3(1066-1085) przez otrzymane specyficzne przeciwciała IgY (dot blotting).

Fig. 4 przedstawia wykres przedstawiający zdolność przeciwciał IgY do wykrywania epitopu białka CA 15-3(1066-1085).

Fig. 5 przedstawia wykres mianowania przeciwciał IgY do detekcji epitopu białka CA 15-3-(1066-1085).

Fig. 6 przedstawia miano przeciwciał anti-CA 15-3(1066-1085) IgY oraz ich reaktywność z albuminą wołową (BSA).

Fig. 7 przedstawia zdolność detekcji natywnej i zdenaturowanej formy epitopu białka CA 15-3-(1066-1085) przez przeciwciała IgY.

Fig. 8 przedstawia wykres przedstawiający awidność otrzymanych przeciwciał anti-CA 15-3-(1066-1085) w czasie immunizacji. Abs* - przedstawione wartości absorbancji po odjęciu wartości absorbancji otrzymanych dla kontrolnych przeciwciał IgY.

Fig. 9 przedstawia zdolność detekcji epitopu białka CA 15-3(1066-1085) przez otrzymane specyficzne przeciwciała IgY (western blotting).

Fig. 10 przedstawia detekcję epitopu białka CA 15-3(1066-1085) przez specyficzne przeciwciała IgY (western blotting).

1.1 Synteza peptydu.

Peptyd o sekwencji CYQELQRDISEMFLQIYKQGG, otrzymano wykorzystując technikę syntezy na podłożu stałym z użyciem żywicy H-L-Gly-2-chlorotrylowej o podstawieniu 0,75 mmol/g. Etapy sprzęgania kolejnych aminokwasów prowadzono z wykorzystaniem strategii Fmoc/Boc. Sprzęganie

aminokwasów prowadzono z użyciem HBTU jako czynnika sprzęgającego w obecności DIPEA. Do usunięcia grupy ochronnej Fmoc stosowano 20% roztwór piperydyny w DMF. W celu odłączenia peptydu od żywicy zastosowano mieszaninę TFA/TIPS/EDT/fenol w stosunku 92,5:2,5:2,5:2,5 (v/v). Otrzymany peptyd oczyszczono z wykorzystaniem techniki HPLC a masę potwierdzono przy pomocy spektroskopii mas.

1.2. Synteza koniugatu CA 15-3(1066-1085)-KLH

Do roztworu białka KLH w 10 mM buforze fosforanowym (pH 7,0) powoli dodano roztwór GMBS w DMSO. Reakcję prowadzono 2h w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając, po czym zaktywowane białko KLH-MB oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii żelowej. Frakcje zawierające białko połączono, a następnie rozcieńczono acetonitrylem aż jego końcowe stężenie wyniosło 25%. Do roztworu KLH-MB dodano powoli roztwór peptydu w 50% acetonitrylu w wodzie delikatnie mieszając. Wartość pH mieszaniny utrzymywano w granicach 1,2-1,4 przy pomocy 1M wodnego roztworu NaOH. Postęp reakcji monitorowano przy użyciu chromatografii HPLC.

1.3. Synteza koniugatu CA 15-3(1066-1085)-BSA

Do roztworu białka BSA w buforze PB powoli dodano roztwór GMBS w DMSO. Reakcję prowadzono 30 min w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając, po czym zaktywowane białko BSA-MB oczyszczono z wykorzystaniem chromatografii żelowej. Frakcje zawierające białko połączono a następnie rozcieńczono acetonitrylem, aż jego końcowe stężenie wyniosło 25%. Do roztworu BSA-MB dodano powoli roztwór peptydu w 50% acetonitrylu w wodzie delikatnie mieszając. Wartość pH mieszaniny utrzymywano w granicach 7,0-7,4 przy pomocy 1M wodnego roztworu NaOH. Postęp reakcji monitorowano przy użyciu chromatografii HPLC.

2.1. Przygotowanie antygeny do immunizacji.

Koniugat CA 15-3(1066-1085)-KLH o sekwencji

CYQELQRDISEMFLQIYKQGG rozpuszcza się tuż przed wykonaniem iniekcji w mieszaninie sterylnego roztworu soli fizjologicznej i pełnego adiuwantu Freund'a przy pierwszej immunizacji oraz niepełnego adiuwantu Freund'a przy dawkach przypominających w stosunku 1:1 (v/v).

2.2. 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).

2.3. 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.

2.4. 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 sącdek 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 1 gY 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).

P r z y k ł a d 3. Analiza odpowiedzi immunologicznej na podany antygen CA 15.3(1066–1085) 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 w postaci koniugatu CA 15-3(1066-1085)-BSA (50ng peptydu/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 (PBST, 10 mM, pH 7,4) naniesiono na opłaszczoną antygenem płytkę mikrotitracyjną i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C. Detekcję kompleksów epitop białka CA 15-3(1066-1085)-przeciwciała IgY wykonano przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY sprzężonego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu *O*-fenylenodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplitek. Dla każdego tygodnia procesu immunizacji pomiar przeprowadzony został dla czterech izolatów przeciwciał anti-CA 15-3(1066-1085) IgY (fig. 2).

P r z y k ł a d 4. Analiza specyficzności przeciwciał IgY anti-CA 15-3(1066-1085) w teście dot blotting w czasie procesu immunizacji.

W celu potwierdzenia specyficzności otrzymanych przeciwciał specyficznych wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) wykonano analizę dot blotting. W tym celu koniugat CA 15-3(1066-1085)-BSA (50 ng peptydu w buforze fosforanowym/studzienkę) naniesiono na membranę nitrocelulozową i inkubowano w temperaturze pokojowej do czasu, aż cały roztwór przesączył się grawitacyjnie przez membranę. 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 IgY specyficzne wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) 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 1h 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.

P r z y k ł a d 5. Limit detekcji epitopu białka CA 15-3(1066-1085) w teście ELISA.

W celu określenia limitu detekcji epitopu białka CA 15-3(1066-1085) przez otrzymane specyficzne przeciwciała IgY wykorzystano enzymatyczny test immunosorpcyjny fazy stałej (ELISA) w sposób opisany powyżej. W tym celu 96 dołkową płytkę mikrotitracyjną opłaszczono koniugatem CA 15-3-(1066-1085)-BSA w różnych stężeniach w przedziale od 1000 ng/ml do 5 ng/ml peptydu (100 µl/studzienkę). Po inkubacji z antygenem (12h, 4°C) i zablokowaniu wolnych miejsc (10% mleko w buforze PBS) płytkę inkubowano z roztworem przeciwciała IgY specyficznego wobec epitopu białka CA 15-3-(1066-1085) rozcieńczonego 100-krotnie 0,5% roztworem mleka odtłuszczonego w buforze fosforanowym zawierającym 0,05% (v/v) Tween-20. Detekcję kompleksów epitop CA 15-3(1066-1085)-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu *D*-fenylenodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplitek. Jako kontroli użyto przeciwciała z grupy kontrolnej w analogicznych rozcieńczeniach. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 4).

P r z y k ł a d 6. Miano przeciwciał – test ELISA.

Miano otrzymanych przeciwciał specyficznych wobec antygeny CA 15-3(1066-1085) określono przy użyciu testu ELISA. Płytkę opłaszczono koniugatem CA 15-3(1066-1085)-BSA w ilości 50 ng peptydu/studzienkę. Po inkubacji z antygenem (12h, 4°C) i zablokowaniu wolnych miejsc (10% mleko w buforze PBS) przygotowano serię rozcieńczeń specyficznych oraz kontrolnych przeciwciał IgY w zakresie od 1:50 do 1:50000 i inkubowano z opłaszczoną antygenem płytką. Detekcję kompleksów epitop CA 15-3(1066-1085)-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu *O*-fenylenodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikroplitek. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 5).

P r z y k ł a d 7. Miano przeciwciał anti-CA 15-3(1066-1085) IgY i ich reaktywność z BSA.

Miano oraz reaktywność z albuminą wołową (BSA) otrzymanych przeciwciał specyficznych wobec antygeny CA 15-3(1066-1085) określono przy użyciu testu ELISA. Płytkę opłaszczono antygenem (CA 15-3(1066-1085)-BSA lub albuminą wołową) w ilości 100 ng/studzienkę. Po inkubacji z antygenem (12h, 4°C) i zablokowaniu wolnych miejsc (10% mleko w buforze PBS) przygotowano serię rozcieńczeń przeciwciał IgY (specyficznych wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) oraz przeciwciał kontrolnych) w zakresie od 1:100 do 1:10 000 i inkubowano z opłaszczoną antygenami płytką mikrotitracyjną. Detekcję kompleksów CA 15-3(1066-1085)-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu *O*-fenylenodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490nm za pomo-

czą czytnika mikropłytek. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 6). Przeciwciała kontrolne wykazały brak reaktywności z epitopem białka CA 15-3(1066-1085) oraz przeciwciała specyficzne wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) nie wykazywały reaktywności z albuminą wołową.

P r z y k ł a d 8. Określenie zdolności przeciwciał IgY do detekcji zdenaturowanego epitopu białka CA 15-3(1066-1085).

W celu określenia zdolności otrzymanych przeciwciał anti-CA 15-3(1066-1085) do detekcji zdenaturowanego epitopu białka CA 15-3(1066-1085) wykorzystano test ELISA. W tym celu studzienki płytki mikrotitracyjnej opłaszczono natywnym koniugatem CA 15-3(1066-1085)-BSA oraz koniugatem CA 15-3(1066-1085)-BSA, który został poddany wcześniejszej denaturacji termicznej (koniugat zagotowano przez 10 minut w temperaturze 100°C) w ilości 50 ng peptydu/studzienkę. Po inkubacji z antygenem (12h, 4°C) i zablokowaniu wolnych miejsc (10% mleko w buforze PBS) płytkę inkubowano z roztworem przeciwciała IgY specyficznego wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) lub przeciwciała kontrolnego (1:100). Detekcję kompleksów epitop CA 15-3(1066-1085)-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylenodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikropłytek. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 7).

P r z y k ł a d 9. Awidność przeciwciał anti-CA 15-3(1066-1085) – ELISA

W celu określenia awidności otrzymanych przeciwciał anti-CA 15-3(1066-1085) wykorzystano test ELISA. W tym celu studzienki płytki mikrotitracyjnej opłaszczono natywnym koniugatem CA 15-3(1066-1085)-BSA w ilości 50 ng peptydu/studzienkę. Po inkubacji z antygenem (12h, 4°C) i zablokowaniu wolnych miejsc (10% mleko w buforze PBS) płytkę inkubowano z roztworami specyficznymi wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) 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 epitop CA 15-3(1066-1085)-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu O-fenylenodiaminy jako chromogenicznego substratu. Pomiaru absorbancji dokonano przy długości fali 490 nm za pomocą czytnika mikropłytek. Wszystkie pomiary wykonano w dwóch powtórzeniach (fig. 8).

P r z y k ł a d 10. Limit detekcji epitopu białka CA 15-3(1066-1085) – western blotting

W celu określenia limitu detekcji epitopu białka CA 15-3(1066-1085) w technice western blotting w pierwszym etapie wykonano rozdział elektroforetyczny (SDS PAGE, 4%–12%) koniugatu CA 15-3(1066-1085)-BSA w warunkach redukujących w ilości mieszczącej się w zakresie od 200 ng do 10 ng peptydu na 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 epitopu białka CA 15-3(1066-1085) przeciwciała IgY (1:100, 0,5% mleko/PBST). Detekcję kompleksów CA 15-3(1066-1085)-IgY przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD (fig. 9).

P r z y k ł a d 11. Miano przeciwciał – western blotting.

W celu określenia zakresu stężeń otrzymanych specyficznych przeciwciał klasy IgY w technice western blotting niezbędnego do detekcji epitopu białka CA 15-3(1066-1085) wykonano analizę techniką western blotting wykorzystując koniugat CA 15-3(1066-1085)-BSA (200 ng peptydu na studzienkę). Po transferze białek na membranę nitrocelulozową i blokowaniu wolnych miejsc (5% mleko/PBST) paski membrany inkubowano z roztworami specyficznego wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) przeciwciała IgY rozcieńczonego w zakresie od 1:100 do 1:5000. Po wypłukaniu pasków membrany buforem PBST detekcję związanych z antygenem specyficznych przeciwciał przeprowadzono przy użyciu przeciwciała króliczego anti-IgY skoniugowanego z peroksydazą chrzanową przy zastosowaniu chemiluminescencyjnego substratu. Analizę obrazów wykonano przy zastosowaniu systemu obrazowania molekularnego zaopatrzonego w kamerę CCD (fig. 10).

Zastrzeżenia patentowe

1. Przeciwciała poliklonalne klasy IgY specyficzne wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) izolowane z żółtka jaj drobiu immunizowanego białkowym antygenem w postaci koniugatów peptydów z białkiem nośnikowym hemocyjaniną, o sekwencji peptydu 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 epitopu białka CA 15-3(1066-1085), **znamienny tym**, że immunizuje się drób białkowym antygenem w postaci koniugatów peptydów z białkiem nośnikowym hemocyjaniną o sekwencji peptydu przedstawionej wzorem 1, przy czym immunizację prowadzi się 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%.

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

5. Zastosowanie przeciwciał poliklonalnych klasy IgY specyficznych wobec epitopu białka CA 15-3(1066-1085) do wytwarzania testu diagnostycznego do detekcji białka CA 15-3 oraz jego fragmentu epitopowego *in vitro*.

Rysunki

CYQELQRDISEMFLQIYKQGG

Wzór 1

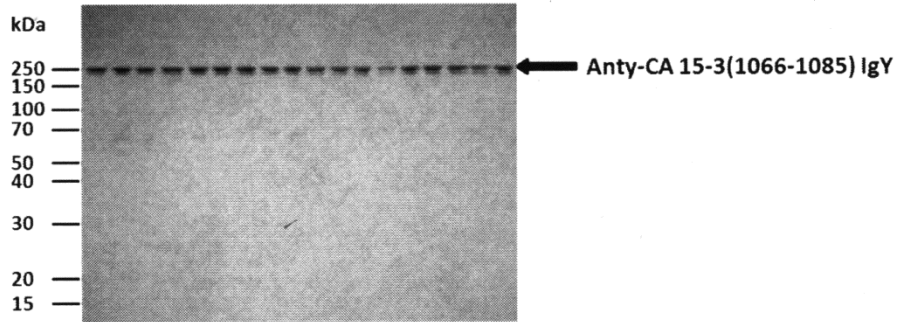


Fig. 1

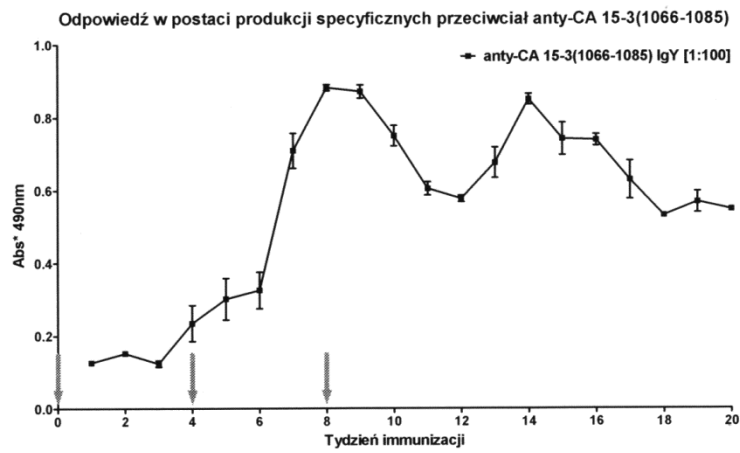


Fig. 2

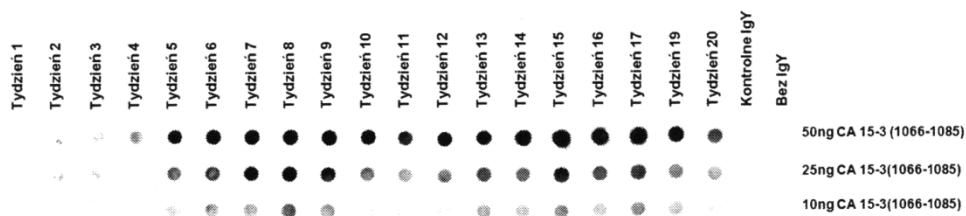


Fig. 3

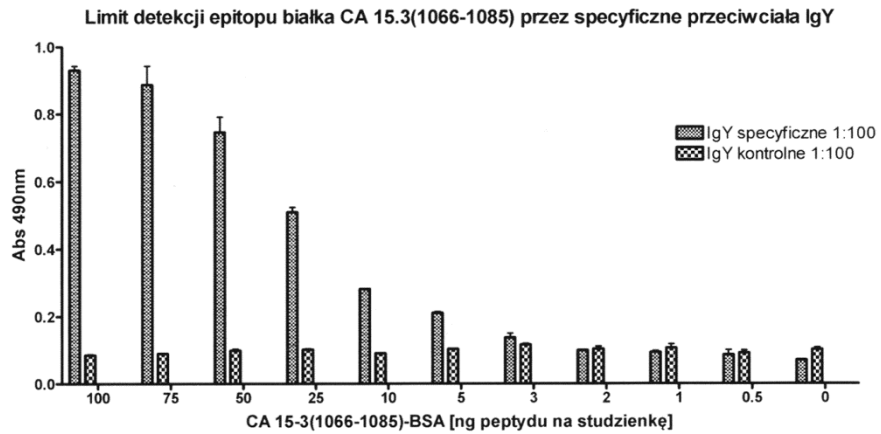


Fig .4

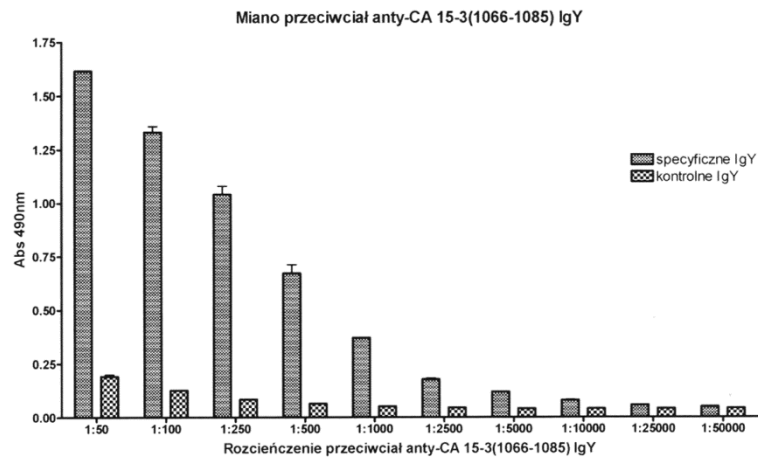


Fig .5

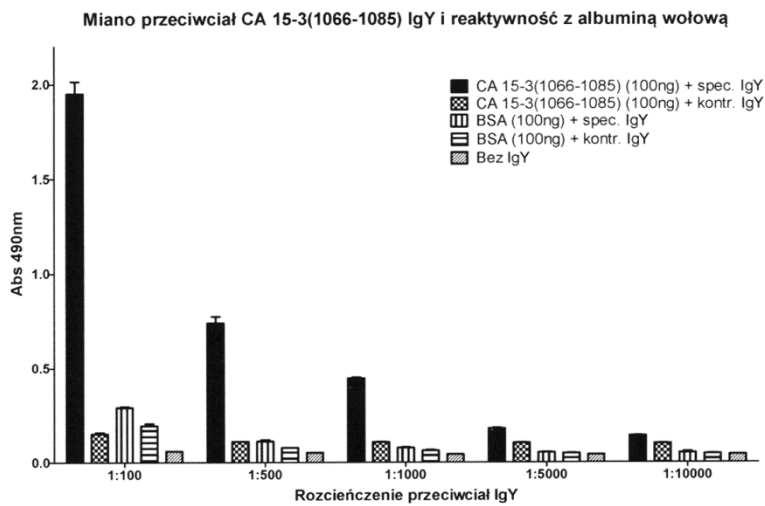


Fig . 6

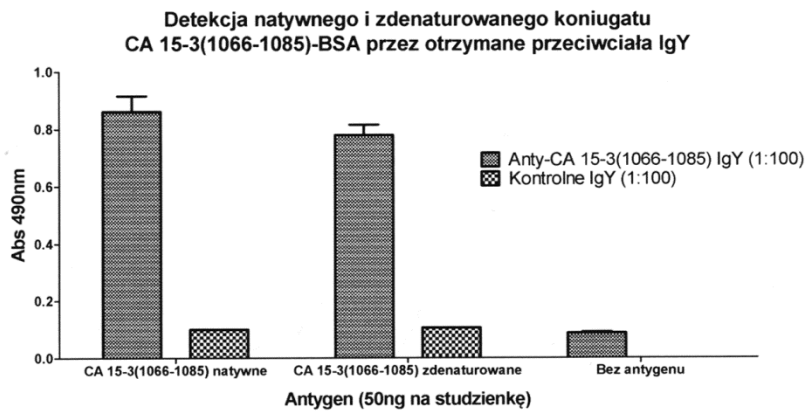


Fig.7

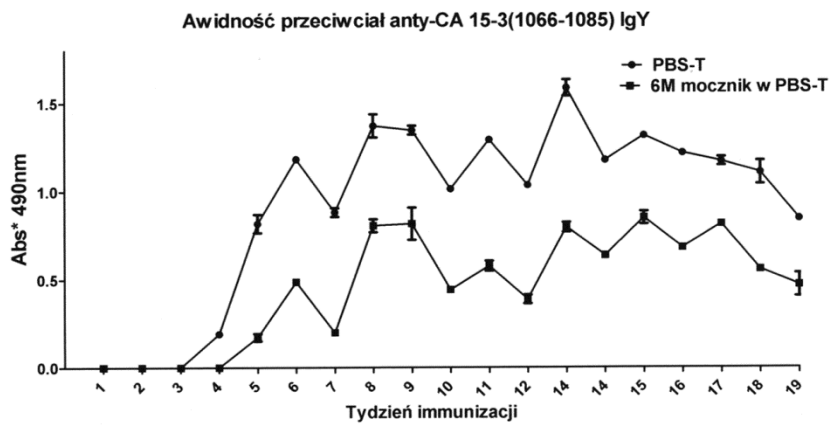


Fig.8

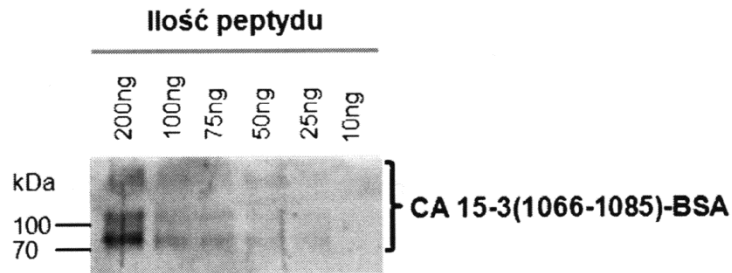


Fig.9

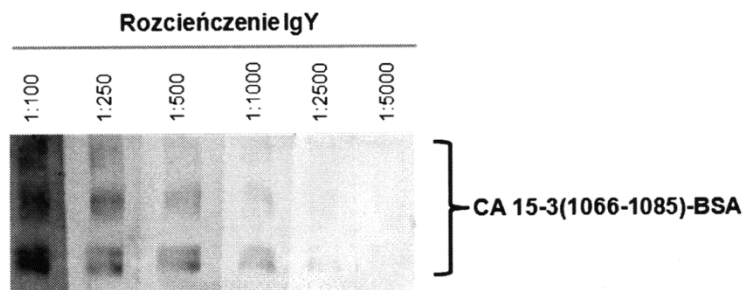


Fig.10