

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245097 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440617**

(22) Data zgłoszenia: **2022.03.14**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.09.18 BUP 38/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.05.13 WUP 20/2024**

(51) MKP:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
MARCIN SIĘCZYK, Wrocław, PL
RENATA GRZYWA, Wrocław, PL
AGNIESZKA ŁUPICKA-SŁOWIK, Milicz, PL
JULIA KOMOROWSKA, Pęgów, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Test immunochromatograficzny do detekcji białka ADA i sposób otrzymywania koniugatu złota koloidalnego z przeciwciałami anti-ADA1 IgY

PL 245097 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest test immunochromatograficzny do detekcji białka ADA w próbkach surowicy, w oparciu o zmodyfikowane specyficzne przeciwciała IgY, który znajduje zastosowanie w medycynie, zwłaszcza do diagnostyki obniżonej odporności.

Wynalazek dotyczy również sposobu otrzymywania koniugatu złota koloidalnego z przeciwciałami anty-ADA1 IgY.

Testy immunochromatograficzne określane mianem testów paskowych lub testów przepływu boczego (ang. lateral flow assays) pozwalają na szybkie wykonanie oraz interpretację wyników dzięki zastosowaniu znaczników umożliwiających ocenę wizualną (charakter półilościowy). (Dzantiev et al. 2014) Wykorzystywane są w diagnostyce medycznej oraz w tzw. diagnostyce przyłóżkowej (ang. point-of-care testing). (Liu et al. 2011) Ze względu na stosunkowo prostą konstrukcję i krótki czas analizy stanowią alternatywę dla kosztownych i czasochłonnych metod instrumentalnych wykorzystywanych w laboratoriach diagnostycznych. Zaletą testów przepływu boczego jest także mała objętość próbki potrzebnej do wykonania analizy, a w większości przypadków również możliwość bezpośredniej aplikacji materiału biologicznego. (Sajid et al. 2015)

Deaminaza adenozyiny (aminohydrolaza adenozyiny, EC 3.5.4.4, ADA) jest głównym enzymem szklaku metabolizmu puryn. ADA katalizuje nieodwracalną reakcję deaminacji adenozyiny do inozyiny oraz 2'-deoksyadenozyiny do 2'-deoksyinozyiny. (Bradford et al. 2017) Najwyższy poziom enzymu zaobserwowano w narządach układu limfatycznego – węzłach chłonnych, śledzionie i grasicy. (Cristalli et al. 2001) ADA pełni istotną rolę w różnicowaniu i proliferacji limfocytów. (Poursharifi et al. 2009) Największą aktywność enzymatyczną ADA odnotowano w limfocytach T, dlatego też może być uważana za marker komórkowej odpowiedzi immunologicznej. (Sapkota et al. 2017)

W organizmie człowieka ADA występuje w formie dwóch izoenzymów jako ADA1 oraz ADA2. (Zavialov et al. 2010) Ludzka ADA1 została zidentyfikowana na powierzchni erytrocytów, trombocytów, neuronów i komórek nabłonka. Obecna jest również w niskich stężeniach w surowicy krwi. (Larijani et al. 2016) Główną funkcją ADA1 jest obniżanie poziomu wewnątrzkomórkowej adenozyiny, która jest toksyczna dla limfocytów, jak również innych komórek. Adenozyina i jej pochodne powodują apoptozę limfocytów, dlatego brak ADA1 jest przyczyną rozwoju ciężkiego złożonego niedoboru odporności (ang. severe combined immunodeficiency, SCID). Natomiast zastosowanie specyficznego inhibitora – pentostatyny do czasowej inhibicji ADA1 spowalnia proliferację komórek rakowych u osób chorujących na białaczkę poprzez zwiększenie stężenia deoksyadenozyiny w komórkach nowotworowych. (Zavialov et al. 2010)

ADA2 należy do rodziny czynników wzrostu wykazujących aktywność deaminazy adenozyiny (ang. adenosine deaminase growth factors, ADGFs). (Zavialov & Engström 2005) Podstawowym miejscem ekspresji tej izoformy enzymu są komórki prezentujące antygen oraz układ monocytarno-makrofagowy. Wykazano, że ADA2 jest odpowiedzialna za różnicowanie się monocytów w makrofagi. (Zavialov et al. 2010) ADA2 osiąga najwyższe stężenia w miejscu występowania stanu zapalnego, wiążąc się z receptorami na powierzchni komórek. (Zavialov & Engström 2005) Poziom ADA2 jest podwyższony u pacjentów z przewlekłymi chorobami wątroby oraz przy chorobach takich jak AIDS, cukrzyca, gruźlica, toczeń rumieniowaty układowy i reumatoidalne zapalenie stawów. (Larijani et al. 2016) Deficyt, nadekspresja lub zaburzenia w aktywności izoenzymów ADA prowadzą do poważnych zmian w organizmie człowieka, które skutkują rozwojem groźnych chorób. Jednym z powodów jest nagromadzenie substratów metabolizmu puryn, które mają wpływ na procesy komórkowe.

Jak dotąd, w literaturze naukowej i patentowej, nie opisano prototypu testu immunochromatograficznego do detekcji białka ADA w surowicy oraz sposobu otrzymywania koniugatu złota koloidalnego z przeciwciałami anty-ADA1 IgY.

Istotą wynalazku jest test immunochromatograficzny do detekcji białka ADA1 w ludzkiej surowicy charakteryzujący się tym, że jako czynnik detekcyjny zawiera przeciwciała IgY specyficzne wobec deaminazy adenozyiny (ADA1) izolowane z żółtka jaj drobiu immunizowanego białkowym antygenem w postaci koniugatu złota koloidalnego z przeciwciałami anty-ADA1 IgY.

Sposób otrzymywania koniugatu złota koloidalnego z przeciwciałami anty-ADA1 IgY polega na tym, że do roztworu chlorku złota (III) dodaje się wyizolowanych i oczyszczonych przeciwciał IgY specyficznych wobec deaminazy adenozyiny (ADA1) inkubując przez 30 minut, następnie dodaje się roztworu surowiczej albuminy wołowej (BSA) w buforze boranowym i inkubuje przez kolejne 10 min, po czym próbkę wiruje się przy prędkości 6000 obrotów na minutę, otrzymany osad zawiesza się w roztworze surowiczej albuminy wołowej (BSA) w buforze boranowym o objętości identycznej jak objętość

próbki przed wirowaniem i ponownie poddaje się wirowaniu, przy czym czynność wirowania powtarza się trzykrotnie.

Korzystnie, gdy sposób prowadzi się przy pH = 9,0.

Korzystnie, gdy przeciwciała IgY specyficzne wobec deaminazy adenozy (ADA1) dodaje się roztworu chlorku złota (III) w stężeniu wyznaczonym za pomocą miareczkowania.

Korzystnie, gdy oczyszczenie przeciwciał anti-ADA1 IgY prowadzi się metodą chromatografii powinowactwa.

Korzystnie, gdy surowiczą albuminę wołową (BSA) dodaje się w nadmiarze w stosunku do przeciwciał IgY, w celu zapobieżenia agregacji.

Przedmiot wynalazku opisany jest bliżej w przykładach wykonania oraz na przedstawionych rysunkach, spośród których:

fig. 1 przedstawia analizę elektroforetyczną i barwienie srebrem przeciwciał anti-ADA IgY oczyszczanych metodą chromatografii powinowactwa: frakcja zebrana po inkubacji (FT, ang. flow through), frakcja z pierwszego płukania (W1), frakcje z płukania kolumny buforem PBS-T (W1, W15), frakcje z płukania kolumny buforem PBS (W16, W20), frakcje po elucji buforem cytrynianowym (K1-K5),

fig. 2 przedstawia analizę specyficzności przeciwciał anti-ADA1 IgY wobec białka ADA1 opłaszczanego na membranie nitrocelulozowej, pasek 2 stanowi kontrolę negatywną, gdzie membranę opłaszczono buforem PBS i inkubowano z anti-ADA1 IgY.

fig. 3 przedstawia schemat budowy opracowanego testu immunochromatograficznego, T – pole testowe, C – pole kontrolne, białym kolorem oznaczono membranę nitrocelulozową, na którą nachodzi pole materiału poliestrowego z nałożonym koniugatem (gładki szary). Na końcu paska umieszczono materiał absorpcyjny.

fig. 4 przedstawia limit detekcji białka ADA1, wykonany z użyciem opracowanego testu przepływu bocznego, intensywność – różnica intensywności prążków na linii testowej dla rozcieńczeń i próbki o zerowym stężeniu,

fig. 5 przedstawia limit detekcji białka ADA1 w surowicy ludzkiej w teście immunochromatograficznym w układzie podwójnego wiązania z wykorzystaniem przeciwciał IgY.

Przykład 1. Oczyszczanie przeciwciał IgY

1.1. Oczyszczanie przeciwciał anti-ADA1 IgY metodą chromatografii powinowactwa.

Przeciwciała IgY specyficzne wobec białka ADA1 pozyskuje się z żółtek jaj od kur, które poddano immunizacji domięśniowej przy użyciu białka ADA1. Izolowane surowe przeciwciała poddaje się następnie oczyszczaniu metodą chromatografii powinowactwa. W pierwszej kolejności złożę CNBr-Sepharose 4B (75 mg) umieszcza się w kolumnie chromatograficznej i przemywa roztworem 1 mM HCl (10 x 1 ml) i buforem węglanowym (100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8,3; 2 x 0,5 ml). Następnie do kolumny wprowadza się 75 µg białka ADA1 przygotowanego w buforze węglanowym o objętości 300 µl. Kolumnę inkubuje się 1 h w temperaturze pokojowej, a następnie przez noc w 4°C. Kolumnę przemywa się naprzemiennie 0,1 M kwasem octowym z 0,1 M octanem sodu (5 x 1 ml; pH 4,0) i Tris-HCl (5 x 1 ml; pH 8,0). Kolumnę przechowuje się w 4°C. Na przygotowane złożę chromatograficzne nakłada się surowe izolaty przeciwciał IgY rozcieńczone w 10 mM buforze PBS (10 mM fosforan sodu, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) z dodatkiem 25 mM EDTA (pH 7,4) w stosunku 1 : 3 (izolat : bufor PBS). Po godzinnej inkubacji, złożę przemywa się piętnastokrotnie buforem PBS-T (1 ml; 10 mM PBS, 25 mM EDTA, 0,1% Tween 20) i pięciokrotnie buforem PBS (1 ml). Elucję specyficznych przeciwciał przeprowadza się z wykorzystaniem buforu cytrynianowego (0,5 ml; 20 mM cytrynian sodu, pH 2,5). Każdą frakcję neutralizuje się przy użyciu 1 M roztworu Tris-base. Objętość buforu neutralizującego dostosowuje się eksperymentalnie tak, aby końcowe pH roztworu wynosiło około 7,4. Czystość uzyskanych przeciwciał potwierdza się techniką SDS-PAGE (4–12%, warunki nieredukujące) i barwieniem srebrem. Uzyskane wyniki przedstawiono na fig. 1.

1.2. Analiza specyficzności przeciwciał anti-ADA1 IgY oczyszczonych metodą chromatografii powinowactwa.

Analizę specyficzności oczyszczonych przeciwciał IgY anti-ADA1 przeprowadza się metodą dot blot. Membranę nitrocelulozową opłaszcza się białkiem ADA1 (50 ng/studzienkę, 100 µl) w buforze PBS. W kolejnym kroku blokuje się wolne miejsca wiążące na membranie 5% roztworem odtłuszczonego mleka w buforze PBS-T (10 mM PBS, 0,05% Tween 20) przez noc w 4°C. Następnie membranę płucze się buforem PBS-T (3 x 15 min.) i inkubuje z 2 ml roztworu specyficznych przeciwciał IgY anti-ADA1 rozcieńczonych w 0,5% mleku w PBS-T do stężenia 1 µg/ml (1 h, 37°C). Po trzykrotnym przepłukaniu membrany (PBS-T, 3 x 15 min.) inkubuje się z przeciwciałami anti-IgY IgG-HRP (2 ml, 1 : 5000; 1 h,

37°C). Detekcję kompleksów antygen-przeciwciało wykonuje się przy pomocy chemiluminescencyjnego substratu. Uzyskany sygnał obrazuje się przy pomocy systemu obrazowania. Uzyskane wyniki przedstawiono na fig. 2.

Przykład 2. Przygotowanie i funkcjonalizacja nanocząstek złota przeciwciałami anti-ADA1 IgY.

W kolbie okrągłodennej umieszcza się 165,6 ml wody destylowanej, a następnie dodaje 16,56 mg chlorku złota (III). Roztwór podgrzewa się mieszając co kilka minut, a po zagotowaniu dodaje 1% roztwór cytrynianu sodu w ilości 3312 µl. Po dodaniu cytrynianu sodu roztwór zmienia barwę na ciemnoszary, a podczas dalszego podgrzewania uzyskuje barwę purpurową. Po dalszych 5 minutach gotowania roztwór studzi się do temperatury pokojowej i doprowadza do pH = 9 przy pomocy 0,2 M roztworu węglaanu sodu. Roztwór nanocząstek złota przechowuje się w temperaturze pokojowej.

Modyfikację powierzchni nanocząstek złota przy użyciu specyficznych przeciwciał IgY przeprowadza się dodając 3 ml przeciwciał IgY (25 µg/ml) przygotowanych w 10 mM buforze PB (2,5 mM NaH₂PO₄, 7,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) do 30 ml roztworu złota koloidalnego i inkubując przez 30 minut w temperaturze pokojowej delikatnie mieszając. W kolejnym kroku dodaje się 3 ml 10% roztworu BSA w 20 mM buforze boranowym (pH 8,0) i inkubuje przez kolejne 10 min w temperaturze pokojowej. Próbkę następnie wiruje się przez 30 minut (6000 rpm, 21°C). Otrzymany osad zawieszają się w 4% roztworze BSA w buforze boranowym, o objętości identycznej jak objętość próbki przed wirowaniem i ponownie wiruje jak opisano powyżej. Czynność powtarza się trzykrotnie.

Przykład 3. Wykonanie testu immunochromatograficznego

3.1 Przygotowanie testu.

Test paskowy przygotowuje się na prostokątnym pasku plastiku o wymiarach 0,5 x 8 cm. Następnie na pasek nakleja się membranę nitrocelulozową o porowatości 0,45 µm (0,5 x 4 cm). Element wnoszący do testu czynnik detekcyjny – nanocząstki złota funkcjonalizowane przeciwciałami IgY specyficznymi wobec deaminazy adenozyne stanowi pasek (0,5 x 2 cm) z materiału poliestrowego z naniesionym koniugatem złota koloidalnego z przeciwciałami anti-ADA1 IgY. Przykleja się go tak, aby połowa jego długości przykrywała membranę nitrocelulozową. Na drugim końcu paska, przykleja się materiał absorbujący (papier do blottingu, włókno celulozowe, 0,8 mm) (fig. 3). Przed rozpoczęciem testu na membranę nitrocelulozową nakłada się trzykrotnie (susząc po każdej aplikacji) przeciwciała anti-IgY (1 mg/ml) w miejscu linii kontrolnej paska. W miejscu linii testowej nakłada się w analogiczny sposób specyficzne przeciwciała anti-ADA1 IgY (296,5 µg/ml). W kolejnym kroku membranę blokuje się w buforze blokującym (10 mM Tris, 1% Tween 20, 0,75% BSA; pH 8,2) w 37°C przez 1 h. Następnie na bibułę tworzącą pole koniugatu nakłada się 40 µl zmodyfikowanych specyficznymi przeciwciałami IgY anti-ADA1 nanocząstek złota i pozostawia do wyschnięcia.

Po całkowitym osuszeniu pasków testowych i pola koniugatu, test składa się przy pomocy taśmy dwustronnej wg schematu (fig. 3).

3.2 Prowadzenie testu immunochromatograficznego.

Test immunochromatograficzny przeprowadza się nakładając na pole koniugatu 135 µl analizowanego materiału przygotowanego w buforze PBS, zawierającym 1% BSA, 5% sacharozy, oraz 0,6% Tween-20 (pH 7,4).

3.3 Oznaczenie limitu detekcji białka ADA1 w teście immunochromatograficznym.

W celu wyznaczenia limitu detekcji białka ADA1 wykonuje się test przepływu bocznego dla różnych stężeń antygeny w analizowanej próbce. Test przeprowadza się na paskach testowych przygotowanych według punktu 3.1. W celu wyznaczenia limitu detekcji antygeny do buforu PBS zawierającego 1% BSA, 5% sacharozy oraz 0,6% Tween-20; (pH 7,4) dodaje się białko ADA1 o stężeniach: 1, 0,5, 0,25, 0,1, 0,05, 0,025, 0,01, 0,005, 0 µg/ml. Wyniki przedstawiono na fig. 4.

3.4 Oznaczenie limitu detekcji białka ADA1 w surowicy ludzkiej.

W celu określenia potencjału diagnostycznego testu w odniesieniu do próbek surowicy ludzkiej wyznaczono limit detekcji deaminazy adenozyne dodanej do ludzkiej surowicy kontrolnej w zakresie stężenia od 5 do 0,05 µg/ml. Uzyskane wyniki przedstawiono na fig. 5.

Zastrzeżenia patentowe

1. Test immunochromatograficzny do detekcji białka ADA1 w ludzkiej surowicy **znamienny tym**, że jako czynnik detekcyjny zawiera przeciwciała IgY specyficzne wobec deaminazy adenozy (ADA1) izolowane z żółtka jaj drobiu immunizowanego białkowym antygenem w postaci koniugatu złota koloidalnego z przeciwciałami anti-ADA1 IgY.
2. Sposób otrzymywania koniugatu złota koloidalnego z przeciwciałami anti-ADA1 IgY **znamienny tym**, że do roztworu chlorku złota (III) dodaje się wyizolowanych i oczyszczonych przeciwciał IgY specyficznych wobec deaminazy adenozy (ADA1) inkubując przez 30 minut, następnie dodaje się roztworu surowiczej albuminy wołowej (BSA) w buforze boranowym i inkubuje przez kolejne 10 min, po czym próbkę wiruje się przy prędkości 6000 obrotów na minutę, otrzymany osad zawiesza się w roztworze surowiczej albuminy wołowej (BSA) w buforze boranowym o objętości identycznej jak objętość próbki przed wirowaniem i ponownie poddaje się wirowaniu, przy czym czynność wirowania powtarza się trzykrotnie.
3. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że prowadzi się przy pH = 9,0.
4. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że przeciwciała IgY specyficznych wobec deaminazy adenozy (ADA1) dodaje się roztworu chlorku złota (III) w stężeniu wyznaczonym za pomocą miareczkowania.
5. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że oczyszczenie przeciwciał anti-ADA1 IgY prowadzi się metodą chromatografii powinowactwa.
6. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że surowiczą albuminę wołową (BSA) dodaje się w nadmiarze w stosunku do przeciwciał IgY, w celu zapobieżenia agregacji.

Rysunki

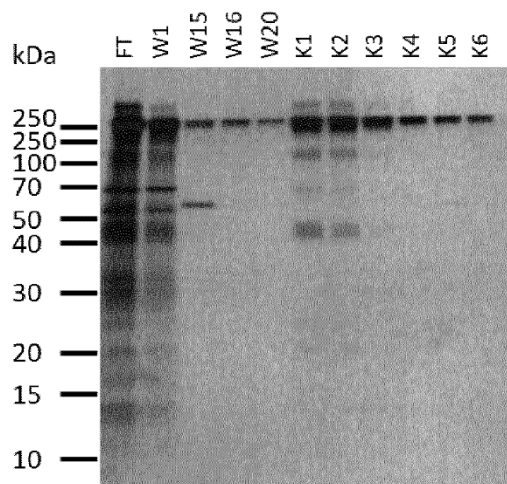


Fig. 1

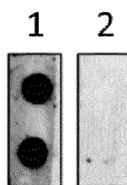


Fig. 2

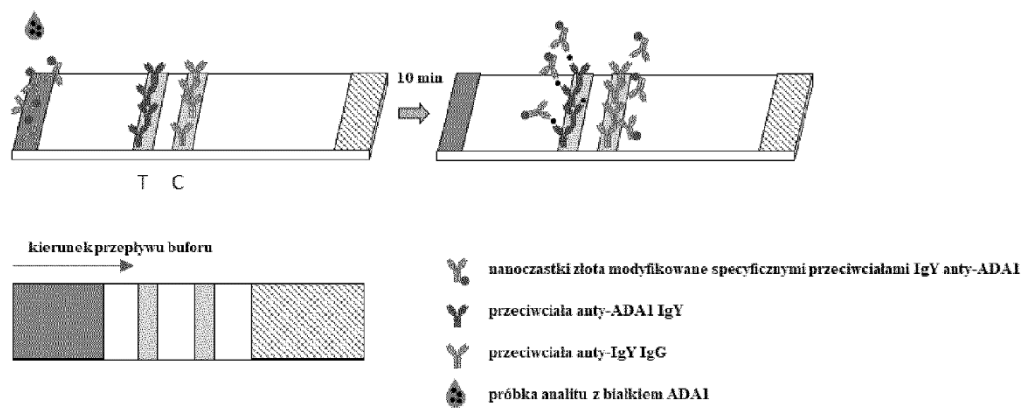


Fig. 3

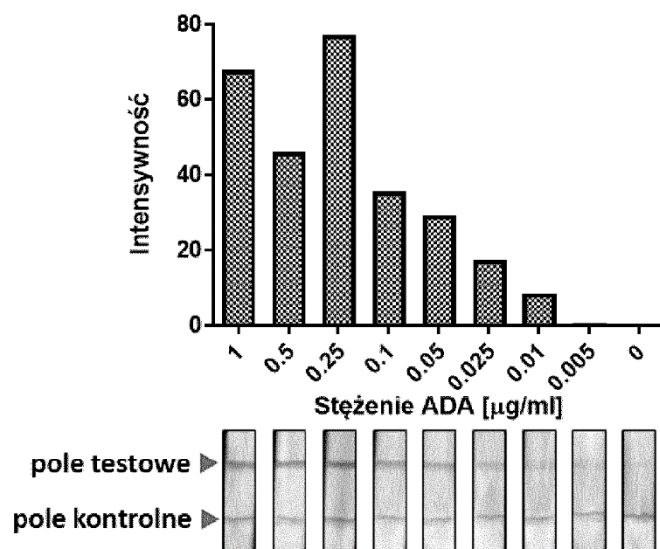


Fig. 4

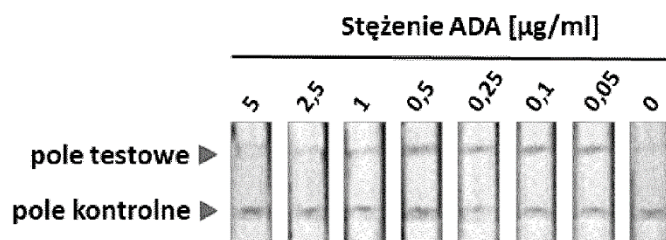


Fig. 5