



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101164** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)
B82Y 35/00
B82Y 5/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

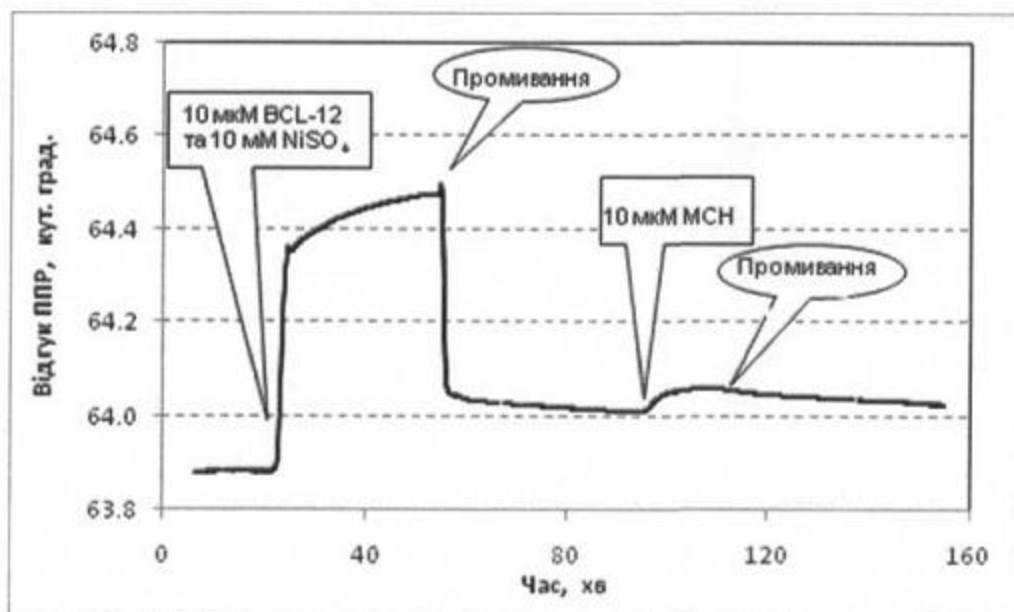
(21) Номер заявки: u 2015 02749	(72) Винахідник(и): Рачков Олександр Едуардович (UA), Бахмачук Анна Олегівна (UA), Мацишин Микола Йосипович (UA), Солдаткін Олексій Петрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 26.03.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.08.2015	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.08.2015, Бюл.№ 16	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
	(74) Представник: Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363

(54) СПОСІБ ІММОБІЛІЗАЦІЇ НА ПОВЕРХНІ ЗОЛОТА РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ, ЩО МІСТЯТЬ В СВОЄМУ СКЛАДІ ПОЛІГІСТИДИНОВУ МІТКУ

(57) Реферат:

Спосіб іммобілізації на поверхні золота рекомбінантних білків, що містять в своєму складі полігистидинову мітку, проводять безпосередньо у вимірювальній комірці сенсора для аналізу біохімічних середовищ, а саме на очищену золоту поверхню, яка служить одночасно і дном вимірювальної комірки, одразу наносять суміш тіольованого похідного NTA, N-[N α ,N α -біс(карбоксиметил)-L-лізін]-12-меркаптододеканаміду та солі нікелю, інкубують цю суміш протягом 30 хв. при кімнатній температурі, промивають модифіковану сенсорну поверхню вимірювальної комірки 10 мМ фосфатним буферним розчином рН 7,2 зі 150 мМ NaCl, вводять у вимірювальну комірку розчин вибраного рекомбінантного білка, що містить в своєму складі полігистидинову мітку, та інкубують протягом 30 хв. при кімнатній температурі, контролюючи ефективність процесу іммобілізації в режимі реального часу.

UA 101164 U



Фіг. 1

Корисна модель належить до біотехнології, біофізики, аналітичної біохімії та медицини, а більш конкретно до способу іммобілізації на поверхні золота рекомбінантних білків, що містять в своєму складі полігістидинову мітку, і може бути використана з метою створення біосенсорних систем для вивчення міжмолекулярних взаємодій та детектування біологічно активних речовин.

Загальний спосіб очищення рекомбінантних білків оснований на селективній взаємодії полігістидинової мітки, яка злита з цільовим білком, і метал-хелатуючим адсорбентом нітрилотриоцтової кислоти (NTA) був описаний Hochuli E. та ін. у 1988 р. [1]. Сьогодні цей підхід є найбільш широко використовуваним методом афінної хроматографії, якщо не хроматографії взагалі [2]. Деякі похідні NTA були використані також для іммобілізації рекомбінантних білків на твердій поверхні різного хімічного складу з метою створення біосенсорних систем [3, 4] для формування наноструктурованих кремнієвмісних матеріалів [5], для доставки модельних білків до цитозолу клітин [6].

На основі проведення патентно-інформаційних досліджень авторами роботи було встановлено, що на сьогодні застосування тількиованого похідного NTA, а саме N-[Na, Na-біс(карбоксиметил)-L-лізін]-12-меркаптододеканаміду (далі по тексту BCL-12), для іммобілізації рекомбінантних білків на поверхні золота з метою створення біосенсорних систем для вивчення міжмолекулярних взаємодій та детектування біологічно активних речовин не описано в жодному з патентів. BCL-12 є комерційно доступним і може бути використане для розробки способу іммобілізації на поверхні золота рекомбінантних білків, що містять в своєму складі полігістидинову мітку.

Відомий спосіб застосування похідних NTA для іммобілізації рекомбінантних білків, що мають в своєму складі полігістидинову мітку, на поверхні золота реалізується фірмою "Biacore" (тепер підрозділ фірми "GE Healthcare", США). Спочатку на поверхню золота наносять карбоксиметильований декстран, до якого ковалентно пришивають NTA. Підготовлену таким чином сенсорну поверхню розміщують у біосенсорі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) фірми "Biacore" і обробляють іонами Ni^{2+} . Після цього над такою поверхнею пропускають білки, що містять в своєму складі полігістидинову мітку, і виявляють їх зв'язування за допомогою біосенсора. Потім сенсорну поверхню регенерують розчином ЕДТА, після чого він готовий до нового циклу аналізу, починаючи з введення розчину Ni^{2+} [7]. Основним недоліком описаного вище способу є наявність проміжних стадій іммобілізації декстрану на золотій сенсорній поверхні, його активація і тільки після того приєднання NT A, що ускладнює спосіб, вимагає більше часу підготовки чипу для іммобілізації. Ці процедури проводять так, що в режимі реального часу неможливо контролювати їх ефективність. Приготовлений таким чином чип монтують у біосенсорну систему фірми "Biacore" і перед стадією іммобілізації рекомбінантних білків, що містять в своєму складі полігістидинову мітку, проводять попередню обробку розчином солі нікелю для насичення координативних сайтів. І тільки після того вводять розчин обраного білка і проводять його іммобілізацію на сенсорній поверхні. Цей спосіб реалізується в продукті "Sensor Chip NTA", який коштує приблизно 4000 шведських крон (більше 12000 грн.). Крім того, сам "Sensor Chip NTA" може бути використаний тільки разом з біосенсорними системами фірми "Biacore", які коштують сотні тисяч євро.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити простий, швидкий і дешевий спосіб іммобілізації на поверхні золота рекомбінантних білків, що містять в своєму складі полігістидинову мітку, з метою створення біосенсорних систем для вивчення міжмолекулярних взаємодій та детектування біологічно активних речовин.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом іммобілізації на поверхні золота рекомбінантних білків, що містять в своєму складі полігістидинову мітку, у якому, відповідно до пропозиції, іммобілізацію проводять безпосередньо у вимірювальній комірці сенсора для аналізу біохімічних середовищ, а саме на очищену золоту поверхню, яка служить одночасно і дном вимірювальної комірки, одразу наносять суміш тількиованого похідного NTA, BCL-12 та солі нікелю, інкубують цю суміш протягом 30 хв. при кімнатній температурі, промивають модифіковану сенсорну поверхню вимірювальної комірки 10 мМ фосфатним буферним розчином рН 7,2 зі 150 мМ NaCl, вводять у вимірювальну комірку розчин вибраного рекомбінантного білка, що містить в своєму складі полігістидинову мітку, та інкубують протягом 30 хв. при кімнатній температурі, контролюючи ефективність процесу іммобілізації в режимі реального часу.

Суть пропонованої корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де:

- на Фіг. 1 схематично представлено відгук, пов'язаний з процесом модифікації золотої сенсорної поверхні похідним NTA-BCL-12;

- на Фіг. 2 схематично представлено сенсограму ППР з сенсорними відгуками, отриманими після введення розчинів різної концентрації рекомбінантного білка A *Staphylococcus aureus*, що

містять в своєму складі полігістидинову мітку (SPA), тобто пов'язаними з іммобілізацією цього білка;

- на Фіг. 3 схематично представлено біологічну активність молекул SPA, іммобілізованих запропонованим способом.

5 Сенсор для аналізу біохімічних середовищ, розроблено в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова [патент України на корисну модель № 57177, опублікований 10.02.2011 р., Бюл. № 3/2011, МПК: G01N 21/55].

Приклад конкретного виконання способу. Водний розчин 10 мкМ BCL-12 та 10 мкМ NiSO₄ вносили у вимірювальну комірку сенсора для аналізу біохімічних середовищ, дном якої слугувала золота сенсорна поверхня. При цьому кінцева SH-група BCL-12, формуючи сульфід золота, надійно закріплюється на сенсорній поверхні, а на протилежному кінці BCL-12, що експонується в розчин, між трьома карбоксильними групами та атомом азоту, з одного боку, та іоном Ni²⁺, з іншого боку, формуються 4 координаційні зв'язки, утворюючи сайт приєднання для двох залишків гістидину, що присутні в складі полігістидинової мітки відповідного рекомбінантного білка. Ефективність процесу модифікації золотої сенсорної поверхні координаційним комплексом BCL-12 з іоном Ni²⁺ спостерігали в режимі реального часу на сенсограмі (Фіг. 1). Після інкубації протягом 30 хв. і промивання водою різниця між сенсорним відгуком до і після введення зразка свідчили про успішне приєднання координаційного комплексу BCL-12 з іоном Ni²⁺ до золотої сенсорної поверхні. Вартість кількості BCL-12, 10 необхідної для модифікації одного сенсорного чипа, складає менше 1 грн. Введення 10 мМ меркаптогексанолу (MCH) для пасивації поверхні, щоб зменшити рівень неспецифічної сорбції, завершувало процес підготовки до стадії іммобілізації рекомбінантних білків, що містять в своєму складі полігістидинову мітку.

На Фіг. 2 показано залежність сенсорного відгуку від концентрації SPA і повна відсутність зміни сигналу ППР при введенні контрольного розчину (без SPA). Промивання буферним розчином після іммобілізації SPA приводить до незначних змін сенсорного відгуку, що свідчить про надійне закріплення на сенсорній поверхні у складі координаційного комплексу більшої частини іммобілізованих молекул SPA.

Фіг. 3 демонструє біологічну активність іммобілізованих запропонованим способом молекул SPA, а саме їх властивість ефективно взаємодіяти з імуноглобулінами, наприклад IgG людини. Введення розчинів різної концентрації IgG викликають сенсорні відгуки, величина яких залежить як від концентрації SPA при його іммобілізації (тобто від рівня поверхневої густини SPA на золотій сенсорній поверхні), так і від концентрації IgG. Контрольні вимірювання (введення розчинів різної концентрації IgG на сенсорну поверхню, модифіковану координаційними комплексами BCL-12 з іоном Ni²⁺, але без SPA) показали залежні від концентрації IgG, але дуже незначні сенсорні відгуки, обумовлені процесами неспецифічної сорбції.

Отже, запропоновано простий, швидкий і дешевий спосіб іммобілізації на поверхні золота рекомбінантних білків, що містять в своєму складі полігістидинову мітку, з метою створення біосенсорних систем для вивчення міжмолекулярних взаємодій та детектування біологічно активних речовин. Використання тіольованого похідного NTA, N-[Na, Na-біс(карбоксиметил)-L-лізин]-12-меркаптододеканаміду дозволило надійно іммобілізувати білки, що містять в своєму складі полігістидинову мітку, наприклад рекомбінантний аналог білка A *Staphylococcus aureus* (SPA). При цьому іммобілізовані білки зберігають свої біологічні властивості, наприклад здатність ефективно взаємодіяти з імуноглобулінами. Таким чином, запропонований спосіб 45 забезпечує умови для подальшої розробки платформи для створення імунобіосенсорних систем різної антигенної специфічності.

Джерела інформації:

1. Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R., and Stuber, D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nature Biotechnology*, 1988, 6, 1321-1325.
2. Block H., Maertens B., Spriestersbach A., Brinker N., Kubicek J., Fabis R., Labahn J., Schafer F. Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. *Meth Enz.*, 2009, 463, Chapter 27, 439-473.
3. Kroger D., Liley M., Schiweck W., Skerra A., Vogel FL, Biosens. Bioelectron., 1999, 14, 155.
4. Sigal G. B., Bamdad C, Barberis A., Strominger J., Whitesides G. M. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 490.
5. Tahir M.N., Theato P., Muller W.E.G., Schroder H.C., Janshoff A., Zhang J., Huth J., Tremel W. Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein. 2004, *Chem. Comm.*, № 24, 2848-2849.

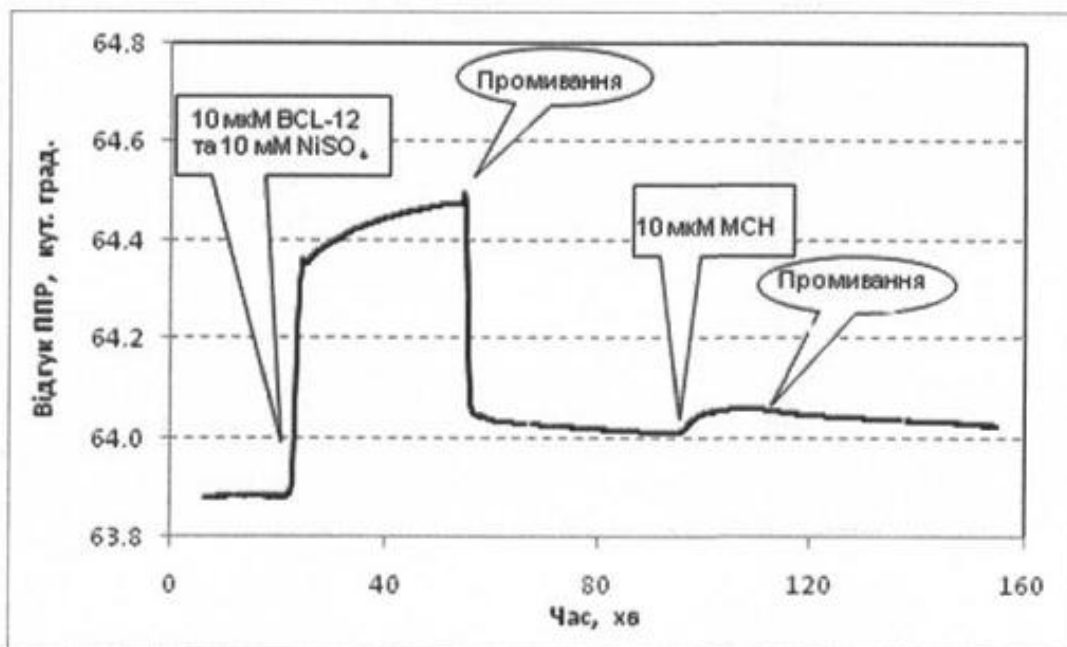
6. Morales D.P., Braun G.B., Pallaoro A., Chen R., Huang X., Zasadzinski J.A., Reich N.O. Targeted Intracellular Delivery of Proteins with Spatial and Temporal Control. *Moї. Pharmaceutics*, 2015, 12, 600-609.

7. <https://www.biacore.com/lifesciences/products/Consumables/guide/nta/index.html>

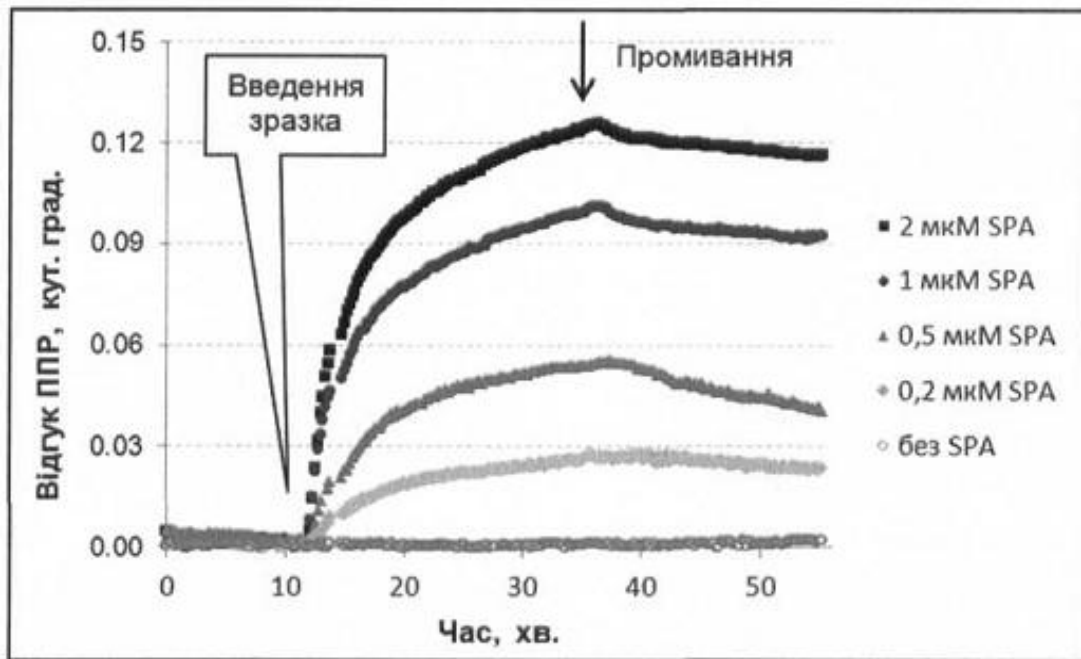
5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

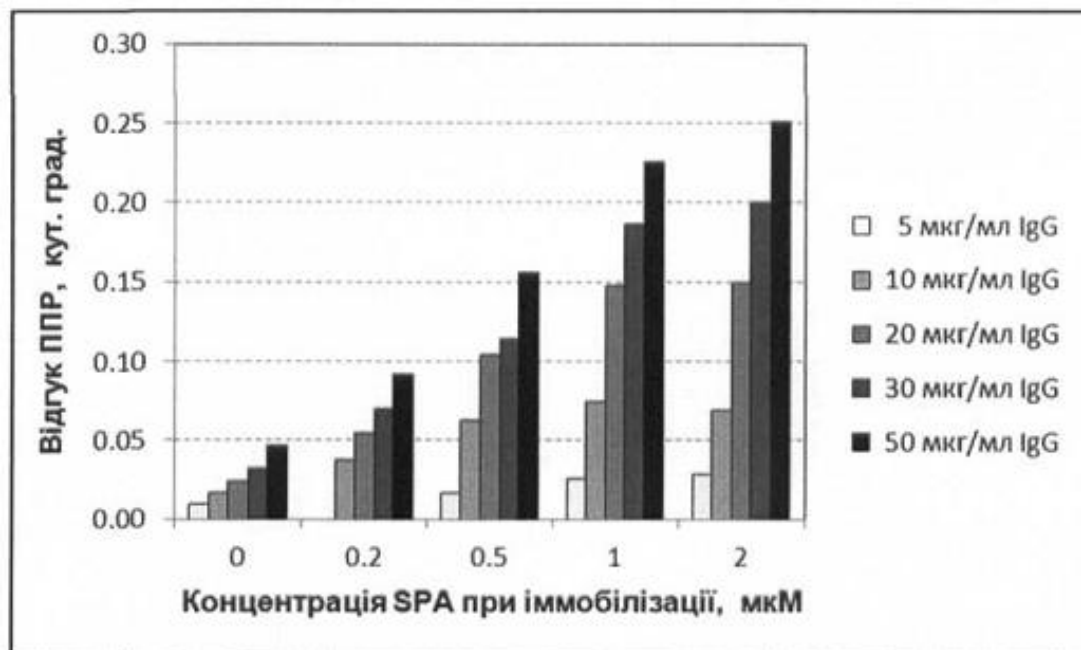
Спосіб іммобілізації на поверхні золота рекомбінантних білків, що містять в своєму складі полігістидинову мітку, який **відрізняється** тим, що іммобілізацію проводять безпосередньо у вимірювальній комірці сенсора для аналізу біохімічних середовищ, а саме на очищену золоту поверхню, яка служить одночасно і дном вимірювальної комірки, одразу наносять суміш тіольованого похідного NTA, N-[N α ,N α -біс(карбоксиметил)-L-лізин]-12-меркаптододеканаміду та солі нікелю, інкубують цю суміш протягом 30 хв. при кімнатній температурі, промивають модифіковану сенсорну поверхню вимірювальної комірки 10 мМ фосфатним буферним розчином рН 7,2 зі 150 мМ NaCl, вводять у вимірювальну комірку розчин вибраного рекомбінантного білка, що містить в своєму складі полігістидинову мітку, та інкубують протягом 30 хв. при кімнатній температурі, контролюючи ефективність процесу іммобілізації в режимі реального часу.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3