



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44815 (13) U
(51) МПК (2009)
C12N 15/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) МОДИФІКОВАНИЙ ГЕННО-ІНЖЕНЕРНИЙ РЕКОМБІНАНТНИЙ БЛОК гExhCD34, ПРОДУКОВАНИЙ БАКТЕРІЯМИ E. COLI

1

2

(21) u200905801

(22) 05.06.2009

(24) 12.10.2009

(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.

(72) КОРДЮМ ВІТАЛІЙ АРНОЛЬДОВИЧ

(73) КОРДЮМ ВІТАЛІЙ АРНОЛЬДОВИЧ

(57) 1. Модифікований генно-інженерний рекомбінантний білок гExhCD34, продукований бактеріями E. coli, імітуючий поверхневий антиген CD34 людини, який містить 269 амінокислотних залишків, має молекулярну масу 28,8 кДа, ізоелектричну точку PI 6,06 і відповідає загальній формулі HhN-гExhCD34-COOH

201
mmldnngtatpelpgtqgtfsnvstnsvyqettptstlgstslhpsvqh
201
neattnitettvkftstsvitsvygntnssvsgstsvistvfttpanvst
201
pettlkpslspgnvslststslatsptkpytssspilsdikaeikcsq
201
irevklitggicleqntsscaefkkgdrgeglarvlcgeeqadadagaqvc
201
slllaqsevrpqcilllvlanrteissklqlmkkhgsdlkklgildfteq
251
vashqsysqktlehhhhh
50
100
150
200
250

2. Рекомбінантний білок гExhCD34 за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить зовнішню клітинну частину антигена CD34 людини, що відповідає амінокислотам 1-261.
3. Рекомбінантний білок гExhCD34 за п. 2, який **відрізняється** тим, що містить лише білкові антигенні детермінанти.
4. Рекомбінантний білок гExhCD34 за п. 1, який **відрізняється** тим, що містить послідовність олигопептидного пептиду загальною формулою (His)_n, де n складає від 3 до 10.

Пропонована корисна модель відноситься до розділу молекулярної біології, генної інженерії, а саме - до модифікованого генно-інженерного рекомбінантного білка гExhCD34 продукованого бактеріями E. coli, який можуть використовувати в біотехнології для одержання діагностичних поліклональних антитіл проти поверхневих маркерів клітин і науково-дослідницької роботи.

Аналогами рекомбінантного білка гExhCD34 є поверхневий антиген CD34 людини, що синтезується різними типами клітин людини, а також лініями мієлобластодних клітин людини KG1 та KG1a у двох формах (385 та 328 амінокислотних залишків (а.з.)), і CD34, одержаний на основі Г.І. технології шляхом експресії клонованого гену в культурі клітин ссавців (Simmons, D.L., Satterthwaite, A.B., Tenen, D.G. and Seed B., Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. J Immunol, 1992. 148(1): p. 267-71.; Mickey C.-T. Hu and Shu L. Chien, The Cytoplasmic Domain of Stem Cell Antigen CD34 Is Essential for Cytoadhesion Signaling But Not Sufficient for Proliferation Signaling. Blood, 1998. 91:

1152-1162.) Рекомбінантних аналогів антигену CD34 людини, які одержують синтезом в бактеріях E. coli, на сьогодні не створено.

CD34 є поверхневим високоглікозильованим білком, який синтезується стромальними клітинами кісткового мозку, клітинами-попередниками гематопоезу, ендотеліальними клітинами, ембріональними фібробластами, нейронами. При патологічних станах CD34 синтезують різні типи гематопоетичних пухлин, а також деякі солідні пухлини (Lanza, F., L. Healy, and D.R. Sutherland, Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. J Biol Regul Homeost Agents, 2001. 15(1): p. 1-13.). Продуктом експресії гена CD34 є білок з молекулярною масою 40кДа і електрофоретичною рухливістю близько 110кДа, що зумовлено наявністю численних вуглеводних залишків в його складі. Антиген локалізується в плазматичній мембрані і містить три домени - високоглікозильований зовнішньоклітинний (258 а.м.к.), трансмембранний (23 а.м.к.) і цитоплазматичний (73 а.м.к.), що містить залишки серину для фосфорилування. CD34 має велике діагностичне значення, а також є ключовим

(13) U

(11) 44815

(19) UA

маркером за яким фракціонують клітини-попередники гематопоезу (гематопоетичні стовбурові клітини) для подальшої їх трансплантації реципієнту після опромінення (Gangenhalli GU, Singh VK, Verma YK, Gupta P, Sharma RK, Chandra R, Luthra PM, Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem Cells Dev*, 2006 Jun;15(3): p.305-13.). Вищезазначені маніпуляції можливі завдяки специфічним моноклональним антитілам, які одержують шляхом імунізації мишей екстрактами клітин, що містять CD34 антиген, і наступним злиттям плазматичних клітин імунізованих тварин з лінією мієлобластоїдних клітин для створення продуцентів моноклональних антитіл - гібридом (Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // *Nature*. - 1975. - Vol. 256, №5517. - P. 495-497). Одержання і відбір гібридом, що синтезують моноклональні антитіла необхідної специфічності, є довготривалим процесом, а продукування та очищення моноклональних антитіл потребує високих затрат на середовища та реактиви. Альтернативним способом є одержання специфічних поліклональних антитіл шляхом імунізації тварин, який, у свою чергу, є значно дешевшим, однак потребує наявності великої кількості високо очищеного білка CD34, що є неможливим у разі використання екстрактів CD34+ клітин як єдиного джерела даного антигену. Відомий CD34-антиген людини Г.І. походження, продукований трансфікованою лінією клітин ссавців COS під контролем промотору плазміді CDM8. Плазміда для синтезу рекомбінантного CD34 містить в собі кДНК послідовність гена CD34 із лінії клітин KG1 розміром 2615.п.н. Білок CD34 синтезується культурою клітин еукаріотів на поверхні плазматичної мембрани у вигляді продукту 110кДа (Simmons, D.L., Satterthwaite, A.B., Tenen, D.G. and Seed B., Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol*, 1992. 148(1): p. 267-71.). Зазначений спосіб одержання антигену CD34 має суттєві недоліки, серед яких можна вказати низький рівень його синтезу клітинами еукаріотів, довготривалість культивування та нестабільність трансфікованої клітинної лінії, високу вартість поживних середовищ, неможливість одержання препаративної кількості антигену в умовах лабораторії і складність процедури його очищення. Також гетерогенний характер приєднання глікозильних залишків до поліпептидного ланцюгу CD34 у разі його синтезу трансфікованою лінією еукаріотичних клітин змінює антигенні властивості CD34, що, в свою чергу, ускладнює його використання у процедурах одержання універсальних специфічних полі- і моноклональних антитіл проти білкових детермінант.

У той же час генно-інженерні технології дозволяють клонувати гени еукаріотів і забезпечувати їх високоефективну експресію в бактеріях *E. coli* (Т. Маніатіс "Молекулярне клонування - Лабораторна збірка методик", Колд Спрінг Харбор Лабораторі, Колд Спрінг Харбор, том 1-3. 1989 р.). Потім білок може бути виділений з бактеріальних клітин і очищений за відомими методиками. У таких спосіб рекомбінантний антиген CD34 може бути одержано

у кількостях, необхідних для імунізації тварин, продукування специфічних поліклональних антитіл та їхнього очищення. Створення технології одержання рекомбінантного антигену CD34 людини потребує вирішення таких завдань, як ідентифікація у складі повно розмірного антигену CD34 імунологічно значущої антигенної детермінанти, дизайн послідовності рекомбінантного антигену для експресії в бактеріях, виділення та клонування ДНК імунологічно значущої антигенної детермінанти CD34, конструювання вектора експресії, одержання штаму-продуценту рекомбінантного антигену, розробка способу суперпродукції рекомбінантного антигену в бактеріях, розробка ефективного та дешевого способу виділення рекомбінантного антигену з бактеріальних клітин в очищеному і розчинному стані.

В основу пропонованої корисної моделі поставлено задачу створення зменшеного рекомбінантного аналога CD34-антигену людини з послідовністю олігогістидину для хроматографічного очищення, який зберігає притаманні нативному білку антигенні детермінанти.

Поставлена задача вирішується пропонованим модифікованим генно-інженерним рекомбінантним білком rExhCD34, продукований бактеріями *E. coli*, імітуючий поверхневий антиген CD34 людини, який містить 269 амінокислотних залишків, має молекулярну масу 28.8кДа, ізоелектричну точку рІ 6.06 і відповідає загальній формулі $H_2N-rExhCD34-COOH$

```

1                                     50
mmslndngtatpelptqgtfsnvstnsvyqettpstlgstslhpsqhg
51                                     100
neattnitettvkftstsvitsvygntnssvsgstsvistvfttpanvst
101                                    150
pettlkpslspgnvsdlsttstslatsptkpytsspsildikaekcsq
151                                    200
irevklrtggiclegnktsscaefkkgdrgeglarvlcgeeqadadagaqvc
201                                    250
slllaqsevrpqclllvlanrteissklqlmkkhqsdllkkgildfteqd
251
vashqsysqktlehhhhh

```

Особливістю рекомбінантного білка rExhCD34 є те, що він містить зовнішню клітинну частину антигену CD34 людини, що відповідає амінокислотам 1-261. Особливістю рекомбінантного білка rExhCD34 є також і те, що він містить лише білкові антигенні детермінанти.

Ще однією особливістю рекомбінантного білка rExhCD34 є те, що він містить послідовність олігогістидинового пептиду загальною формулою $(His)_n$, де n складає від 3 до 10.

Пропонована корисна модель вирішує проблеми відомого рівня техніки і забезпечує джерело рекомбінантного білка, який зберігає притаманні нативному білку антигенні детермінанти, у разі використання технологій рекомбінантних ДНК. Послідовність ДНК поверхневого антигену CD34 людини є загальнодоступною з банку генів Національного Центру Біотехнологічної Інформації США (NCBI accessing number AB238231.1) і може бути клонована у плазмідному експресійному векторі.

У відповідності до пропонованої корисної моделі для одержання ДНК модифікованого генно-інженерного антигену CD34 використовували нову методику клонування ДНК, що передбачала: попередню ідентифікацію імунологічно значущої антигенної детермінанти CD34, яка відповідає модифі-

кованому генно-інженерному рекомбінантному білку gExhCD34, розробку способу ампліфікації цільової ДНК і встроювання в плазмідний вектор для експресії в бактеріях. Як вихідний матеріал для одержання тотальної РНК людини використовували клітинну мієлобластоїдну лінію KG1, яка є загальнодоступною. Матричну РНК одержували із тотальної ДНК хроматографією на оліго-dT-целюлозі. У реакції зворотної транскрипції синтезували одноланцюгову комплементарну ДНК. Вищезазначені процедури детально описано у прикладах. Відповідно до пропозиції ампліфікацію дволанцюгової ДНК здійснювали методом полімеразної ланцюгової реакції з використанням спеціально розроблених для даної процедури ДНК-праймерів, що дозволили клонувати не всю ДНК поверхневого антигену CD34 людини (986 п.н.), а лише ту її частину (780 п.н.), що кодує імунологічно значущий зовнішньоклітинний домен без N-кінцевої послідовності, яка відповідає сигнальному пептиду (амінокислотні залишки 31-291 з бази даних NCBI). Це може бути визначено з використанням стандартних методик, відомих спеціалістам даної галузі. Праймери для ампліфікації вводили до складу ДНК модифікованого рекомбінантного білка унікальні сайти ендонуклеаз рестрикції NdeI і XhoI для вбудовування в плазмідний експресуючий вектор, а також у разі експресії клонованого гена в бактеріях *E. coli* забезпечували утворення рекомбінантного антигену, що містить генно-інженерно введену послідовність гексагістидину (6His-tag) на C-кінці. Це може бути визначено з використанням стандартних методик для аналізу послідовностей ДНК спеціалістами даної галузі. Послідовності праймерів наведено на Фіг.4. Одержані в результаті полімеразної ланцюгової реакції фрагменти дволанцюгової ДНК розділяли електрофорезом в агарозному гелі і оцінювали порівнюючи з маркером молекулярної маси ДНК. Синтезовані фрагменти ДНК при електрофорезі мають розмір близько 800 пар нуклеотидів і використовували для клонування у плазмідний експресуючий вектор для одержання рекомбінантного антигену gExhCD34 в бактеріях *E. coli*. Способи одержання ДНК модифікованого генно-інженерного рекомбінантного білка gExhCD34 будуть легко оцінені спеціалістами даної галузі на основі прикладів і наступного опису. На Фіг.1, 3 представлено послідовності ДНК і поліпептидного продукту gExhCD34 який вона кодує, відповідно до пропозиції.

Суть корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де:

на Фіг.1 показана амінокислотна послідовність рекомбінантного білка. gExhCD34, 269 амінокислот. Молекулярна маса рекомбінантного білка 28.8кДа. Ізоелектрична точка рекомбінантного білка $pI = 6.06$;

на Фіг.2 - послідовність ДНК рекомбінантного білка gExhCD34, 810 п.н.;

на Фіг.3 - послідовності олігонуклеотидних праймерів із сайтами унікальних рестриктаз для ампліфікації ДНК білка gExhCD34 із кДНК і клонування в плазмідному векторі.

Приклад. Одержання ДНК gExhCD34.

Даний приклад описує одержання ДНК що кодує gExhCD34.

Виділення тотальної РНК. Виділення тотальної РНК з клітинної лінії KG1 проводили за методом (Sambrook, Joseph Molecular cloning: a laboratory manual/ E.F. Fitch, T. Maniatis - 2-nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989 V.I, p. 7.19-7.25). До осаду клітин (10^7) додавали 1мл буферу GTB (4М гуанідин тіоціанат; 25мМ цитрат натрію; 0,5% N-лаурилсаркозин; 0,1М 2-меркаптоетанол, pH 7,0), вносили 0,1 об'єму розчину 3М ацетату натрію, pH 5,0, розчин ретельно перемішували та декілька разів пропускали через шприц для руйнування хромосомальної ДНК. Отриманий лізат клітин двічі екстрагували рівним об'ємом суміші фенол/хлороформ/ізоаміловий спирт (1:1:0.02), центрифугували 10хв. 16000g, РНК із супернатанту осаджували 96%-м етанолом. Виділену РНК аналізували електрофорезом у денатурувальних умовах за стандартною методикою (Sambrook, Joseph Molecular cloning: a laboratory manual/ E.F. Fitch, T. Maniatis - 2-nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1989 V.I, p. 7.43-7.45).

Виділення мРНК. Виділення фракції Poly-A(+) РНК проводили афінною хроматографією з використанням оліго-dT-целюлози і рекомендованих протоколів виробника відповідного набору реактивів, наприклад QuickPrep mRNA Purification Kit виробництва GE Healthcare. Концентрацію очищеної мРНК розраховували за значенням адсорбції A_{260} .

Одержання кДНК. З використанням методу зворотної транскрипції полімеразної ланцюгової реакції із матричної РНК, ізольованої із CD34+ клітин, синтезували кДНК за наступною методикою. В стерильну пробірку для ПЛР вносили: мРНК - 0.5мкг, гексануклеотидний праймер з випадковою послідовністю (100uM) - 1мкл, вода чиста від РНК-аз - до загального об'єму 12мкл. Суміш прогрівали 6хв. при 65°C і охолоджували на льоду. В охолоджену суміш вносили 5-ти кратний концентрат реакційного буферу для 3Т-ПЛР - 4мкл, RiboLock™ RNase Inhibitor (20u/μl) виробництва Fermentas - 1мкл, 10mM dNTP mix - 2мкл, RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (200u/μl) виробництва Fermentas - 1мкл до загального об'єму 20мкл, і інкубували при 42°C протягом 60хв.

Одержання дволанцюгової ДНК. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) одержували дволанцюгову ДНК, що кодує рекомбінантний білок gExhCD34, який відповідає зовнішньоклітинному домену поверхневого антигену CD34 людини без послідовності N-кінцевого лідерного пептиду. Для цього використовували олігонуклеотидні праймери, послідовності яких приведено на Фіг.4, і готували наступну суміш: кДНК - 5мкл, 10-ти кратний концентрат буферу для ПЛР - 5мкл, праймер 1 (20uM) - 1мкл, праймер 2 (20uM) - 1мкл, (Pfu ДНК-полімераза - 5 одиниць активності, 2мМ dNTP - 5мкл, 25 MgCl2 - 4мкл, стерильна деіонізована вода - до загального об'єму реакційної суміші 50мкл. Для ампліфікації ДНК проби використовували термоциклер, що програмується. ПЛР проводили за наступних умов: денатурація - 95°C 30сек.,

віджиг праймерів - 55°C 1хв., елонгація - 72°C 1хв. загалом 30 циклів ампліфікації. По завершенню - інкубували 10хв. при 72°C. Продукт ампліфікації виявлявся електрофорезом в 1%-му агарозному

гелі з наступним фарбуванням бромідом етидію і візуалізацією при 312нм у вигляді дискретної по- лоси 810п.н.

```

1
mmsldnngtatpelptqgtfsnvstnvsyqetttpstlgstslhpsvshg 50
51
neattnitettvkftstsvitsvygntnssvqstsvistvfttpanvst 100
101
pettlkpslspgnvsdlsttstslatsptkpytssspilsdikaeikcsg 150
151
irevklgtgicleqntsscaefkkdrgeglarvlggeeqadadagaqvc 200
201
slllaqsevrpqclllvlanrteissklqlmkkhqsdlkklgildfteqd 250
251
Vashqsysqktlehhhhh

```

Фір. 1

```

1
atgatgagctcttgacaacaacggtagctacccagagttacctaacca 50
51
gggaacattttcaaatgtttctacaaatgtatcctaccaagaaactaca 100
101
cacctagtagcccttggaagtagcagcctgcaccctgtgtctcaacatggc 150
151
aatgaggccacaacaacatcacagaaacgacagtagcaaatcacatctac 200
201
ctctgtgataaacctcagtttatggaacacaaaactcttctgtccagtcac 250
251
agacctctgtaatcagcacagtggtcaccacccagccaacgtttcaact 300
301
ccagagacaaccttgaagcctagcctgtcacctggaaatgtttcagacct 350
351
ttcaaccactagcactagccttgcaacatctccactaaacctaatacat 400
401
catcttctcctatcctaagtacatcaaggcagaaatcaaatgttcaggc 450
451
atcagagaagtgaattgactcagggcatctgcctggagcaaaataagac 500
501
ctccagctgtgaggagttaagaaggacaggggagagggcctggcccgag 550
551
tgctgtgtggggaggagcaggtgatgctgatgctggggccaggtatgc 600
601
tcctgtctccttgcccagctctgaggtgaggcctcagtggtctactgctggt 650
651
cttgcccaacagaaacagaaatctccagcaaaactccaacttatgaaaaagc 700
701
accaatctgacctgaaaaagctggggatcctagatttcaactgagcaagat 750
751
gttgcaagccaccagagctattcccaaaagaccctcgagcaccaccacca 800
801
ccaccactga

```

Фір. 2

Праймер 1: 5'-ATCTGAATTCATATGATGAGTCTTGACAACAACGG-3'
 Праймер 2: 5'-TCAATCTCGAGGGTCTTTTGGGAATAGCTCT-3'

Фір. 3