Облікова картка НДДКР

Державний обліковий номер: 0215U003391

Державний реєстраційний номер: 0110U005967

Відкрита

Дата реєстрації: 28-01-2015

1. Етапи виконання

Номер етапу: 1

Назва етапу: Одержання рекомбінантних білків системи зсідання крові та дослідження їх властивостей для діагностики та лікування ДВЗ-синдрому.

Початок етапу: 09-2010

Закінчення етапу: 12-2014

Вид звітного документа: Остаточний звіт

2. Виконавець

Назва організації: Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

Код ЄДРПОУ/ІПН: 05417288

Підпорядкованість: Національна академія наук України

Адреса: 01601, Київ, вул. Леонтовича, 9

Телефон: 234-59-74

Телефон: 279-63-65

E-mail: secretar@biochem.kiev.ua

WWW: www.biochemistry.org.ua

3. Власник результатів НДДКР (продукції)

Назва організації: Інститут біохімії ім. О.В.Паладіна Національної академії наук України

Код ЄДРПОУ/ІПН: 05417288

Адреса: вул. Леонтовича, 9, м. Київ, Київська обл., 01054, Україна

Підпорядкованість: Національна академія наук України

Телефон: 380442796365

Телефон: 380442345974

E-mail: secretar@biochem.kiev.ua

WWW: http://www.biochemistry.org.ua

4. Джерела та напрями фінансування

Підстава для проведення робіт: 34 - договір (замовлення) з центральним органом виконавчої влади, академією наук (головними розпорядниками бюджетних коштів на проведення НДДКР)

КПКВК: 6541030

Напрям фінансування: 2.1 - фундаментальні дослідження

Джерела фінансування

Джерело фінансування: 7713 - кошти держбюджету

Фактичний обсяг фінансування за звітний етап: 226 тис. грн.

5. Науково-технічна робота

Назва роботи (укр)

ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ БІЛКІВ СИСТЕМИ ЗСІДАННЯ КРОВІ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЇХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТА ЛІКУВАННЯ ДВЗ-СИНДРОМУ.

Назва роботи (англ)

RECOMBINANT BLOOD COAGULATION SYSTEM PROTEINS GENERATION AND THEIR CHARACTERISTICS INVESTIGATION FOR DIC-SYNDROME DIAGNOSTICS AND TREATMENT.

Реферат (укр)

Метою даного проекту було одержання моноклональних повнорозмірних і рекомбінантних scFv-антитіл, високоспецифічних до протеїну С людини, придатних для створення на їх основі імунохімічних методів визначення протеїну С в плазмі крові людини для покращення діагностики синдрому дисимінованого внутрішньосудинного зсідання крові (ДВЗ-синдрому) та тромбофілії, а також створення стабільних клітинних ліній для одержання рекомбінантного протеїну С, який може бути застосований для лікування ДВЗ-синдрому. В роботі було застосовано сучасні хімічні, біохімічні, біоінформатичні, імунохімічні та молекулярно-біологічні методи. Протягом виконання проекту було визначено високоімуногенні унікальні амінокислотні послідовності молекули протеїну С, синтезовано пептиди, що відповідають цим послідовностям, та створено їх кон'югати з білками-носіями. Проведено гібридизацію спленоцитів мишей, імунізованих кон'югатом KLH-Pro144-Leu155, із клітинами мієломи X-63Ag8. Одержано стабільний клон-продуцент моноклональних антитіл, специфічних до фрагменту Pro144-Leu155 протеїну С людини. Показано, що монАТ IV-6A, які продукуються цим клоном, специфічно реагують із протеїном С людини та є придатними для розробки імуноферментних тест-систем для визначення протеїну С в плазмі крові. Також було показано, що монАТ IV-6A є придатними для виділення та очистки протеїну С за допомогою афінної хроматографії. Із використанням генетичного матеріалу спленоцитів мишей, імунізованих цілою молекулою протеїну С та кон'югатом KLH із пептидом, що імітує фрагмент Pro144-Leu155 протеїну С людини, одержано бібліотеки імуноглобулінових генів миші, імунні до протеїну С людини та до ділянки Pro144-Leu155 протеїну С. Проведено відбір клонів-продуцентів рекомбінантних scFv-антитіл, які специфічно реагують із протеїном С людини. Найкращий клон субклоновано у векторі pET-22b та отримано високоекспресійний продуцент рекомбінантних scFv-антитіл, специфічних до протеїну С людини, на основі штаму E. coli Rosetta. Показано, що отримані scFv-антитіла 9E розпізнають протеїн С людини в імуноферментному аналізі й імуноблотаналізі та є придатними для розробки імунохімічних методів визначення протеїну С. Одержано дві генетичні конструкції для експресії протеїну С в еукаріотичних клітинах на основі вектору pEGFP з різними промоторами (CMV та EF-1alfa). Трансфіковано ними клітини 3T3, HEK293 та CHO та досліджено експресію клітинами протеїну С. Обрано високоефективний продуцент рекомбінантного протеїну С людини на основі клітин HEK293, трансфікованих pEGFP- N1-протеїн С. Протеїн С-специфічні рекомбінантні scFv-антитіла 9E та монАТ IV-6A в подальшому будуть використані для розробки імунохімічних тест-систем визначення протеїну С в плазмі крові людини, необхідних для діагностики тромбофілій і ДВС-синдрому, а також, у складі афінного сорбенту, для виділення та очищення протеїну С. Високоефективний продуцент рекомбінантного протеїну С може бути застосований для одержання протеїну С, як антитромботичного та асептичного препарату для лікування ДВЗ-синдрому та інших патологій людини.

Реферат (англ)

The aim of this project was the generation of monoclonal antibodies and recombinant scFv-antibodies against human protein C. These antibodies should be suitable for generation of immunochemical methods for human plasma protein C detection in case of disseminated intravascular coagulation syndrome (DIC-syndrome) and trombofilia. Also during this work stable cell lines for

recombinant protein C generation should be obtained. This protein C could be used for DIC-syndrom therapy. In this study modern chemical, biochemical, bioinformatical, immunochemical and molecular biology methods were used. During the project highly immunogenic unique aminoacid sequences of protein C molecule were determined, appropriate peptide synthesized and with carrier proteins conjugated. Splenocytes of mice immunized with KLH-Pro144-Leu155 were hybridized with myeloma X-63Ag8 cells.Stable clone producer of monoclonal antibodies against Pro144-Leu155 fragment of human ptotein C was obtained. It was shown that monoclonal antibodies IV-6A which have been produced by this clone specific bind human protein C and could be used for design immunoenzymes test-systhems for protein C detection in blood plasma. Also it was shown that monoclonal antibodies IV-6A could be used for protein C elution and purification by affinity chromatography. Immune libraries of immunized with protein C and Pro144-Leu155 protein C region-KLH conjugate mice genes were generated. The library was screened against Pro144-Leu155 protein C region-KLH and -BSA conjugates and one scFv producer clone was isolated. Recombinant anti-protein C scFv producing clones were selected. The best clone DNA sequence was subcloned into pET-22b expression vector and recombinant anti-protein C scFv producer based on E. coli Rosetta was obtained. It was shown that obtained 9E scFv antibodies could specific bind protein C in immunoensyme analysis and immunoblotting and could be used for design of immunochemical methods for protein C detection. Two genetic construction for protein C expression in eukaryotic cells based on pEGFP plasmid were design. They contain CMV or EF-1alfa promoter. 3T3, HEK293 and CHO cell lines were transfected with these plasmids. Then protein C expression in these cells were investigated. One effective recombinant protein C producing clone was selected from transected with pEGFP-N1-protein C HEK293 cells. Recombinant scFv antibodies 9E and monoclonal antibodies IV-6A against protein C would be used for design of immunochemical test systhems for protein C detection in human blood plasma, which is important for trombofilia and DIC-syndrome diagnostics as well as affinic sorbents for protein C elution and purification. Recombinant protein C producer could be used for obtaining of protein C as antithrombotic and aceptic agent for DIC-syndrome and other human deseases treatment.

Індекс УДК: 577.2:612.115, 577.112.7:612.115

Коди тематичних рубрик НТІ: 34.15.47

6. Науково-технічна продукція (НТП)

НТП 1

Назва продукції (укр): Клони-продуценти моноклональних повнорозмірних антитіл та рекомбінантних scFv-антитіл, специфічних до протеїну С людини, стабільна клітинна лінія - продуцент рекомбінантного протеїну С людини, моноклональні повнорозмірні антитіла та рекомбінантні scFv-антитіла, специфічні до протеїну С людини, рекомбінантний протеїн С людини.

Назва продукції (англ): Clones-producers of monoclonal full length antibodies and recombinant scFv-antibodies to human protein C, stable cell line - producer of recombinant human protein C, monoclonal full-length antibodies and recombinant scFv-antibodies specific for human protein C, recombinant human protein C.

Очікувані результати:

Галузь застосування: 73.10.1 - Дослідження і розробки в галузі природничих наук

Опис продукції (укр): Стабільний клон-продуцент моноклональних антитіл IV-6A, які з високою специфічністю та афінністю реагують із протеїном С людини, що є придатними для розробки імуноферментних тест-систем для визначення протеїну С в плазмі крові людини та для виділення та очистки протеїну С за допомогою афінної хроматографії. Бібліотека імуноглобулінових генів миші, імунну до протеїну С людини та до ділянки Pro144-Leu155 протеїну С. Високоекспресійний продуцент рекомбінантних scFv-антитіл 9E, специфічних до протеїну С людини, на основі штаму E. coli Rosetta. Показано, що scFv-антитіла 9E розпізнають протеїн С людини в імуноферментному аналізі й імуноблотаналізі та є придатними для розробки імунохімічних методів визначення протеїну С. Стабільний високоефективний продуцент рекомбінантного протеїну С людини на основі клітин HEK293, трансфікованих pEGFP-CMV-протеїн С, та рекомбінантний протеїн С, який може бути застосований як антитромботичний та асептичний препарат для лікування ДВЗ-синдрому та тромбофілій.

Соціально-економічна спрямованість НТП:

Стадія завершеності НТП: Дослідний зразок

Впровадження НТП: Не впроваджено

Строки впровадження: не встановлені

Виробник продукції: Інститут біохімії ім О.В.Палладіна

Споживачі продукції: науково-дослідні інститути

Перспективні ринки: ринки України та зарубіжжя

Права інтелектуальної власності: За договорами

Форми та умови передачі продукції: Продаж ліцензії

7. Бібліографічний опис

Опубліковано 3 тези доповідей: 2.1.1. Palyvoda K.O., Oliinyk O.S., Lugovskaya N.E., Kolibo D.V., Lugovskoy E.V., Komisarenko S.V. Generation and characterization of recombinant single chain variable fragment antibodies against Pro186-Leu197 protein C region. - Тези доповідей міжнародної наукової конференції "Мікробіологія та імунологія - перспективи розвитку в XXI столітті" (10-11 квітня, 2014, м. Київ). Імунологія та алергологія. Наука і практика. - Додаток №1. - 2014. - С. 122. 2.1.2. Oliinyk O., Palyvoda K., Siromolot A., Kolybo D., Komisarenko S. Library of recombinant scFv antibodies as a tool for analysis of naturally occurred human antibody repertoire to different antigens. - Abstract book of International Symposium on Cell Biology jointly with 4rd Ukrainian Congress for Cell Biology (September 17-20, 2014, Uzhorod, Ukraine). - 2014. - P. 39. 2.1.3. Луговськой Е.В., Колеснікова І.М., Костюченко О.П., Паливода К.О., Пидюра М.О., Комісаренко С.В. Моноклональне антитіло до протеїну С з мінімальною гомологією до інших факторів зсідання крові. - Тези доповідей XI Українського біохімічного конгресу (6-10 жовтня, 2014, Київ). The Ukrainian Biochemical Journal. - Vol. 86, № 5 (Supplement 2). - 2014. - P. 99-100. Подано до друку: До "Українського біохімічного журналу": 1. Олійник О.С., Паливода К.О., Луговська Н.Е., Колибо, Д.В. Луговськой Е.В. , Комісаренко С.В. Одержання та характеристика рекомбінантних одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (scFv) проти Pro144-Leu155 ділянки протеїну С людини. 2. Луговськой Е.В., Колеснікова І.М., Костюченко О.П., Паливода К.О., Пидюра М.О., Луговська Н.Е., Макогоненко Є.М., Комісаренко С.В. Моноклональні антитіла, специфічні до протеїну С людини. До журналу "Biotechnologia Acta": 3. Паливода К.О., Олійник О.С., Колибо, Д.В., Луговськой Е.В., Комісаренко С.В. Одержання стабільного клону-продуценту рекомбінантного протеїну С людини.

8. Звітна документація

Кількість сторінок в звіті: 59

Мова звіту: Українська

Кількість файлів у звіті: 1

9. Заключні відомості

Перелік осіб-виконавців

Богатирьова О. А.

Колеснікова І. М.

Костюченко О. П.

Литвинова Л. М.

Луговська Н. Е.

Луговськой Е. В.

Макогоненко Є. М.

Олійник О. С.

Паливода К. О.

Пидюра М.О.

Керівник організації:

Костерін Сергій Олексійович

Керівники роботи:

Комісаренко Сергій Васильович (д. б. н., акад.)

Керівник відділу реєстрації наукової діяльності УкрІНТЕІ

Юрченко Т.А.