Облікова картка ДіР

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0215U003391

Державний реєстраційний номер: 0110U005967

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 28-01-2015

II. Етап виконання ДіР

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

III. Відомості про виконавця ДіР

Повне найменування юридичної особи (або ПІБ фізичної особи): Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України

Код за ЄДРПОУ: 05417288

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Розмір організації:

Телефон: 234-59-74, 279-63-65

IV. Відомості про співвиконавців ДіР

V. Відомості про замовника ДіР

Повне найменування юридичної особи (або ПІБ фізичної особи): Національна академія наук України

Код за ЄДРПОУ: 00019270

Місцезнаходження: вул. Володимирська, 54, м. Київ, Київська обл., 01030, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Розмір організації:

Телефон: 380442396594

VI. Джерела, напрями та обсяги фінансування ДіР

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

Напрям фінансування: 2.1 - фундаментальні дослідження

Джерела фінансування

7713 - кошти держбюджету

Код програмної класифікації видатків і кредитування (КПКВК): 6541030

Фактичний обсяг фінансування (тис. грн.): 226

VII. Відомості про ДіР

Назва роботи українською:

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

Назва роботи англійською:

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

Реферат українською:

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 їнших патологій людини.

Реферат англійською:

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: 34.15.47

Керівники роботи

Власне Прізвище Ім'я По-батькові: Комісаренко Сергій Васильович

Науковий ступінь: д. б. н.

Вчене звання: акад.

Ідентифікатор ORCID ID:

Додаткова інформація:

VIII. Наукова (науково-технічна) продукція (НТП)

Назва НТП українською: 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 НТП англійською: 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.

НТП, яку передбачалося створити:

Причини, через які НТП не було створено:

Отримані результати:

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

Реєстраційний номер картки технології:

Опис НТП: 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:

Вплив НТП на довкілля:

Впровадження НТП: Не впроваджено

Практична реалізація НТП

Початок етапу: не встановлені

Закінчення етапу:

Споживачі продукції: науково-дослідні інститути

Перспективні ринки: ринки України та зарубіжжя

Характер співробітництва з інвестором

Потрібний обсяг інвестицій, тис. грн.: 0

Права, що надаються інвестору після завершення роботи:

Наявність бізнес-плану: Ні

Техніко-економічне обгрунтування: Ні

Потенціальний обсяг продажу, тис. грн.: 0

Очікуваний термін окупності (років):не встановлено

Додаткова інформація: не встановлені

IX. 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.

X. Заключні відомості

Керівник юридичної особи Костерін Сергій Олексійович

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.

Відповідальний за підготовку облікових документів

Телефон

Реєстратор

Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є відповідальним за реєстрацію наукової діяльності

