

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011149846/10, 07.12.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.12.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.12.2011

(45) Опубликовано: 10.03.2013 Бюл. № 7

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: US 20100169986 A1, 01.07.2010. RU
2010133268, 01.01.2011. RU 2010112393,
01.01.2011.

Адрес для переписки:

630055, г.Новосибирск, ул. Речуновская, 15,
ФГУ "ННИИПК имени академика Е.Н.
Мешалкина" Минздравсоцразвития РФ

(72) Автор(ы):

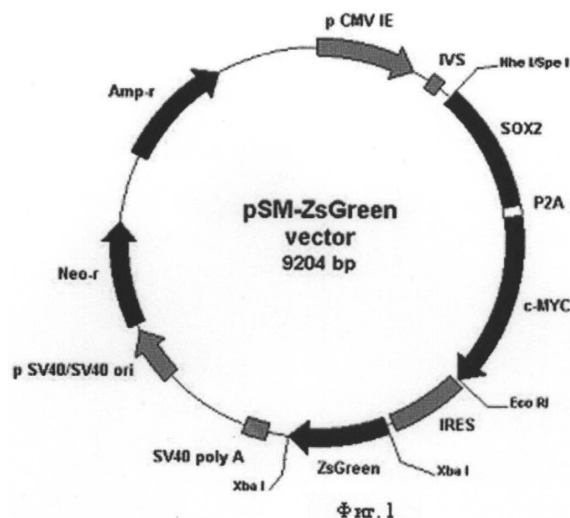
Медведев Сергей Петрович (RU),
Шевченко Александр Игоревич (RU),
Покушалов Евгений Анатольевич (RU),
Закьян Сурен Минасович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Новосибирский научно-
исследовательский институт патологии
кровообращения имени академика Е.Н.
Мешалкина" Минздравсоцразвития РФ,
(ФГБУ "ННИИПК им. акад. Е.Н.
Мешалкина" Минздравсоцразвития России)
(RU),
Учреждение Российской академии наук
Институт цитологии и генетики Сибирского
отделения РАН (RU),
Учреждение Российской академии наук
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины Сибирского
отделения РАН (RU)(54) РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА pSM-ZsGreen, КОДИРУЮЩАЯ БЕЛКИ SOX2 И С-MYC
ЧЕЛОВЕКА И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК ZsGreen, ПРЕДНАЗНАЧЕННАЯ ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области генной инженерии, молекулярной и клеточной биологии и биотехнологии. Предложена рекомбинантная плазмида pSM-ZsGreen, кодирующая белки SOX2 и С-MYC человека и флуоресцентный белок ZsGreen, предназначенная для временной или постоянной экспрессии генов SOX2, С-MYC и ZsGreen в культивируемых клетках человека и обеспечивающая стабильную экспрессию введенного гена. Рекомбинантная плазмида может использоваться в качестве вектора для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. 1 ил., 1 табл.





FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2011149846/10, 07.12.2011

(24) Effective date for property rights:
07.12.2011

Priority:

(22) Date of filing: 07.12.2011

(45) Date of publication: 10.03.2013 Bull. 7

Mail address:

630055, g.Novosibirsk, ul. Rechnunovskaja, 15,
FGU "NNIIPK imeni akademika E.N. Meshalkina"
Minzdravsotsrazvitija RF

(72) Inventor(s):

Medvedev Sergej Petrovich (RU),
Shevchenko Aleksandr Igorevich (RU),
Pokushalov Evgenij Anatol'evich (RU),
Zakijan Suren Minasovich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe
uchrezhdenie "Novosibirskij nauchno-
issledovatel'skij institut patologii
krovoobrashchenija imeni akademika E.N.
Meshalkina" Minzdravsotsrazvitija RF, (FGBU
"NNIIPK im. akad. E.N. Meshalkina"
Minzdravsotsrazvitija Rossii) (RU),
Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk Institut
tsitologii i genetiki Sibirskogo otdelenija RAN
(RU),
Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk Institut
khimicheskoy biologii i fundamental'noj
meditsiny Sibirskogo otdelenija RAN (RU)

(54) **RECOMBINANT PLASMID pSM-ZsGreen, CODING HUMAN PROTEINS SOX2 AND C-MYC AND FLUORESCENT PROTEIN ZsGreen, INTENDED TO PRODUCE INDUCED PLURIPOTENT HUMAN STEM CELLS**

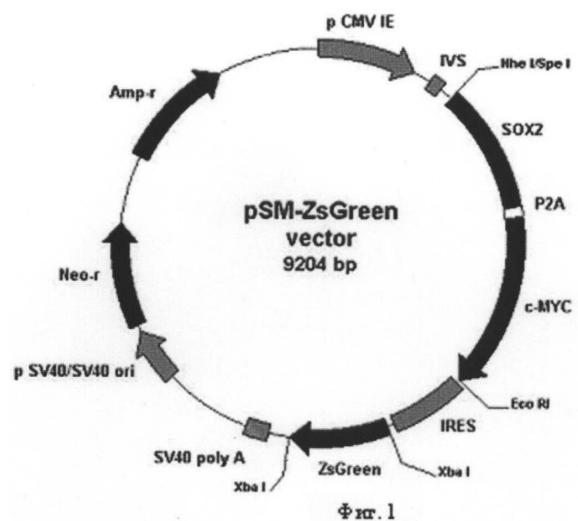
(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: recombinant plasmid pSM-ZsGreen is proposed, which codes human proteins SOX2 and C-MYC and a fluorescent protein ZsGreen, intended for temporary or permanent expression of genes SOX2, C-MYC and ZsGreen in human cultivated cells and providing for stable expression of the introduced gene.

EFFECT: recombinant plasmid may be used as a vector for production of induced pluripotent human stem cells.

1 dwg, 1 tbl



RU 2 4 7 7 3 1 4 C 1

RU 2 4 7 7 3 1 4 C 1

Изобретение относится к области генной инженерии, молекулярной и клеточной биологии, биотехнологии и может быть использовано для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

5 Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) - это тип стволовых клеток, которые могут быть получены из соматических клеток животных и человека в результате повышенной экспрессии набора определенных генов [1-3]. Для получения ИПСК человека и животных успешно используется сверхэкспрессия таких генов как *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* и *c-MYC* [2].

10 Известно, что для получения большинства новых линий ИПСК в настоящий момент используют генетические конструкции, полученные на основе ретро- и лентивирусных векторов. Этот метод характеризуется тем, что происходит случайное встраивание ДНК-копий геномов ретро- или лентивирусов в геномы клеток, что в свою очередь может приводить к нарушению функционирования генов [4].

15 Для полномасштабного применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в фундаментальных и прикладных исследованиях, таких как скрининг новых лекарственных веществ, исследования в области токсикологии и регенеративной медицины, необходимо решение ряда проблем. Во-первых, необходима разработка методов получения ИПСК без генетической модификации их геномов. Во-вторых, способ получения ИПСК должен быть достаточно эффективным.

20 Известно, что плазмидные векторы (плазмиды) могут временно существовать в ядрах клеток, обеспечивая стабильную транскрипцию нуклеотидных последовательностей, находящихся под контролем конститутивных промоторов. Кроме того, известен метод, основанный на использовании специфических последовательностей - 2А-пептидов, позволяющий получать генетические конструкции, обеспечивающие трансляцию нескольких полипептидов (белков) с одной молекулы матричной РНК [5].

30 Задачей данного изобретения является конструирование полицистронной неинтегрирующейся плазмидной конструкции, кодирующей белки *SOX2* и *C-MYC* человека и флуоресцентный белок *ZsGreen*, обеспечивающей одновременную трансляцию данных белков и являющейся вектором при получении индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Белки *SOX2* и *C-MYC* необходимы для запуска репрограммирования клеток, а флуоресцентный белок *ZsGreen* служит маркером трансфекции клеток и последующей элиминации плазмидной ДНК.

Реализация изобретения осуществляется следующим образом.

40 Конструирование рекомбинантной плазмидной ДНК выполняют на основе плазмиды *pIRES* (Clontech) и включает следующие стадии:

1. Выделяют РНК из клеток известной линии эмбриональных стволовых клеток человека *HUES9* [6], и производят синтез кДНК с помощью олиго-(dT) праймеров. Полученную кДНК используют в качестве матрицы для синтеза фрагментов, кодирующих белки;

45 2. Синтез фрагмента кДНК гена *SOX2* -позиции в мРНК 428-1379- (*Homo sapiens* *SRY* (*sex determining region Y*)-box 2) человека, (регистрационный номер в GeneBank *NM_003106.2*), размером 1023 пар нуклеотидов, содержащего на 3'-конце последовательность Р2А-пептида (*SOX2*-Р2А). Синтез проводят с помощью полимеразной цепной реакции с праймерами: *hSOX2* 5' *Xba*I 5'-
50 *TTTAGTGTCTAGAATGTACAACATGATGGAGACGGAGCTG*-3'(прямой праймер, содержит искусственно введенный сайт эндонуклеазы рестрикции *Xba* I) и *hSOX2* Р2А 3'5'-

TTCTCTTCGACATCCCCTGCTTGTTTCAACAGGGAGAAGTTAGTGGCTCCGCTTCCGG
ACATGTGTGAGAGGGGCAGTGTGCCGTTAATG-3' (обратный праймер, содержащий
нуклеотидную последовательность кодирующую пептид P2A);

3. Синтез фрагмента кДНК гена *c-MYC* -позиции в мРНК 571-1891- (*Homo sapiens v-
myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)*) (регистрационный номер в GeneBank
NM_002467.4) размером 1397 пар нуклеотидов, содержащего на 5'-конце
последовательность P2A-пептида (P2A-с-MYC). Синтез проводят с помощью
полимеразной цепной реакции с праймерами: hcMYC P2A 5' 5'-

GCCACTAACTTCTCCCTGTTGAAACAAGCAGGGGATGTCGAAGAGAATCCCGGGCCA
ATGCCCTCAACGTTAGCTTACCAACAGGAAC-3' (прямой праймер, содержащий
нуклеотидную последовательность кодирующую пептид P2A) и hcMYC 3' Sall 5'-
TTTAGCAGTGGTACGTCGACTTACGCACAAGAGTTCCGTAAGCTGTTTC-3' (прямой
праймер, содержит искусственно введенный сайт эндонуклеазы рестрикции *SalI*);

4. Объединение фрагментов SOX2-P2A и P2A-с-MYC осуществляют методом
полимеразной цепной реакции с использованием в качестве матриц перекрывающихся
фрагментов SOX2-P2A и P2A-с-MYC, а также праймеров hSOX2 5'XbaI и hcMYC 3' Sall.
В результате получают фрагмент SOX2-P2A-с-MYC, размером 2373 пар нуклеотидов;

5. Фрагмент ДНК, кодирующий белок ZsGreen, вырезают из плазмиды pZsGreen
(Clontech) эндонуклеазой рестрикции *XbaI* и клонируют в сайт *XbaI*, находящийся в
полилинкере В плазмиды pIRES (Clontech). В результате получена плазида pIRES-
ZsGreen.

6. Фрагмент ДНК SOX2-P2A-с-MYC клонируют с помощью набора реагентов pGEM-
T Easy Vector Systems (Promega) и штамма *E.coli* XL-10 Gold;

7. Клоны плазмиды pGEM-T Easy со встройками pGEM-SOX2-P2A-с-MYC
последовательности выделяют стандартным методом щелочного лизиса (Maniatis, T.,
Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring
Harbor Laboratory Press);

8. Фрагмент SOX2-P2A-с-MYC вырезают из плазмиды pGEM-SOX2-P2A-с-MYC с
помощью эндонуклеаз рестрикции *SpeI* и *EcoRI* и лигируют с плазмидой pIRES-
ZsGreen, гидролизованной эндонуклеазами рестрикции *NheI* и *EcoRI*, сайты которых
расположены в полилинкере А - эндонуклеазы рестрикции *SpeI* и *NheI* имеют
совместимые липкие концы.

В результате получена плазида pSM-ZsGreen размером 9204 п.н. (SM= SOX2, с-
MYC).

На чертеже изображена карта плазмидной генетической конструкции pSM-ZsGreen.
Фрагмент ДНК, кодирующий белки SOX2 и С-MYC, встроен между сайтами *NheI* и
EcoRI в полилинкер А плазмиды pIRES, а ДНК, кодирующая ZsGreen, построена в сайт
XbaI полилинкера В плазмиды pIRES.

Описание и позиции в нуклеотидной последовательности (п.н., пара нуклеотидов)
функциональных элементов генетической плазмидной конструкции pSM-ZsGreen
представлены в таблице 1.

Таблица 1	
Элемент плазмидной генетической конструкции	Позиции в последовательности конструкции, п.н.
p CMV IE - энхансер/промотор цитомегаловируса	1-750
IVS - интрон	890-1022
Промотор РНК-полимеразы T7	1067-1085
Фрагмент ДНК SOX2-P2A-с-MYC	1085-3445
IRES - внутренний сайт посадки рибосом	3474-4055
ZsGreen - кДНК гена ZsGreen	4078-4822

Промотор РНК-полимеразы Т3	4968-4890
SV40 poly A - фрагмент, содержащий сигнал полиаденилирования мРНК вируса SV40	4967-5189
Ориджин репликации f1	5285-5741
p SV40 - энхансер/ранний промотор вируса SV40	5806-6224
SV40 ori - ориджин репликации вируса SV40	6122-6188
Neo-r - ген устойчивости к неомицину	6269-7064
Синтетический сигнал полиаденилирования	7129-7178
Amp-r - ген устойчивости к ампициллину	7590-8451

Полученная плазмидная генетическая конструкция pSM-ZsGreen построена на основе плазмидного вектора pIRES (Clontech), в который помещены фрагменты кДНК генов *SOX2* и *c-MYC* человека, соединенные нуклеотидной последовательностью, кодирующей P2A-пептид и кДНК гена, кодирующего флуоресцентный белок ZsGreen.

Транскрипция единой мРНК SOX2-P2A-c-MYC-IRES-ZsGreen осуществляется с конститутивного промотора p CMV IE, обеспечивающего высокий уровень наработки мРНК. Наличие последовательностей P2A и IRES позволяет одновременно транслировать белки SOX2, C-MYC и ZsGreen с одной молекулы мРНК.

Фрагмент ДНК, кодирующий флуоресцентный белок ZsGreen, является маркером трансфекции клеток и последующей элиминации плазмидной ДНК.

Плазмидная генетическая конструкция pSM-ZsGreen предназначена для временной или постоянной экспрессии генов SOX2, C-MYC и ZsGreen в культивируемых клетках человека и обеспечивает стабильную экспрессию введенного гена.

Рекомбинантная плазида pSM-ZsGreen может использоваться в качестве вектора для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Список использованной литературы

1. Takahashi, K. and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006. 126(4): p. 663-76.
2. Takahashi, K., et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007. 131(5): p. 861-72.
3. Yu, J., et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007. 318(5858): p. 1917-20.
4. Okita, K., et al., Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008. 322(5903): p. 949-53.
5. Szymczak, A.L. and Vignali, D.A., Development of 2A peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. *Expert Opin Biol Ther*, 2005. 5(5): p. 627-38.
6. Cowan, C.A., et al., Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med*, 2004. 350(13): p. 1353-6.

Формула изобретения

1. Рекомбинантная плазида pSM-ZsGreen, кодирующая белки SOX2 и C-MYC человека и флуоресцентный белок ZsGreen, предназначенная для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, представляющая собой генетическую конструкцию на основе плазмиды pIRES, содержащая следующие конструктивные элементы: фрагмент ДНК, кодирующий белки SOX2 и C-MYC человека, включающий последовательность, кодирующую P2A, расположенную между последовательностями SOX2 и C-MYC, встроен между сайтами рестрикции NheI и EcoRI в полилинкер А плазмиды pIRES, размер встройки 2360 пар нуклеотидов, и фрагмент ДНК, кодирующий флуоресцентный белок ZsGreen, встроенный в сайт Xba I полилинкера В плазмиды pIRES; транскрипция полицистронной мРНК SOX2-P2A-C-

MYC-IRES- ZsGreen осуществляется с конструктивного промотора pCMV IE.

2. Рекомбинантная плазмида pSM-ZsGreen по п.1, где разделение последовательностей элементами P2A и IRES позволяет экспрессировать три белка с одной плазмиды одновременно.

5 3. Рекомбинантная плазмида pSM-ZsGreen по п.1, где фрагмент ДНК, кодирующий белки SOX2 и C-MYC человека, запускает репрограммирование клеток для получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, а фрагмент ДНК, кодирующий флуоресцентный белок ZsGreen, является маркером трансфекции клеток и
10 последующей элиминации плазмидной ДНК.

15

20

25

30

35

40

45

50