



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 234 937** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 K 38/17, C 07 K 14/435, C 12 N 15/70, 1/15, A 61 P 17/02**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2002133463/15, 08.12.2000
(24) Дата начала действия патента: 08.12.2000
(30) Приоритет: 13.05.2000 KR 2000/25662
(43) Дата публикации заявки: 27.03.2004
(46) Дата публикации: 27.08.2004
(56) Ссылки: OHNO S. et al. Biochem. Biophys. Acta. - 1999, v. 196, p. 1451. WO 96/01102 A, 18.01.1996. US 5444164 A, 22.08.1995.
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 15.12.2002
(86) Заявка РСТ: KR 00/01428 (08.12.2000)
(87) Публикация РСТ: WO 01/87327 (22.11.2001)
(98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат. пов. Н.Г.Лебедевой

(72) Изобретатель: КИМ Ин-Сан (KR),
КИМ Дзунг-Еун (KR)
(73) Патентообладатель:
РЕДЖЕН БАЙОТЕК, ИНК. (KR)
(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) СПОСОБ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ И ЗАЖИВЛЕНИЯ РАН

(57)
Изобретение относится к медицине и касается пептидов, которые могут быть использованы для клеточной адгезии и заживления ран. Способ адгезии включает использование рекомбинантных белков, содержащих одну или более копий 2-го и/или 4-го внутренних доменов α 5 β 1 с аминокислотной последовательностью 237-377 и 498-637 соответственно. Изобретение также включает экспрессирующие векторы и штаммы E.coli,

трансформированные соответствующими экспрессирующими векторами. Преимущество изобретения заключается в получении пептидов, которые содержат консервативные аминокислотные последовательности, необходимые для активности по прикреплению, расплыванию, отделению клеток и заживлению ран. 8 н. и 1 з.п. ф-лы, 3 табл., 25 ил.





RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 234 937** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 K 38/17, C 07 K 14/435,**
C 12 N 15/70, 1/15, A 61 P 17/02

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2002133463/15, 08.12.2000
(24) Effective date for property rights: 08.12.2000
(30) Priority: 13.05.2000 KR 2000/25662
(43) Application published: 27.03.2004
(46) Date of publication: 27.08.2004
(85) Commencement of national phase: 15.12.2002
(86) PCT application:
KR 00/01428 (08.12.2000)
(87) PCT publication:
WO 01/87327 (22.11.2001)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.
3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. N.G.Lebedevoj

(72) Inventor: KIM In-San (KR),
KIM Dzung-Eun (KR)
(73) Proprietor:
REDZHEN BAJOTEK, INK. (KR)
(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **METHOD FOR CELLULAR ADHESION AND HEALING WOUND**

(57) Abstract:

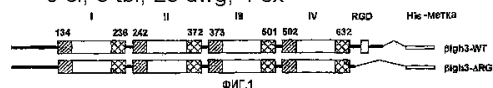
FIELD: medicine, peptides, molecular biology, protein engineering.

SUBSTANCE: invention relates to peptides that can be used for cellular adhesion and healing wounds. The adhesion method involves using recombinant proteins comprising one or more copies of the 2-d and/or the 4-th internal domains pig-h3 with amino acid sequence 237-277 and 498-637, respectively. Invention involves also expressing vectors and strains of E. coli transformed with

corresponding expressing vectors. The advantage of invention involves preparing peptides that comprise conservative amino acid sequences that are necessary for activity by attachment, spreading, separation of cells and healing wounds.

EFFECT: valuable method for adhesion and healing.

9 cl, 3 tbl, 23 dwg, 4 ex



Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к пептидам, которые могут быть использованы для клеточной адгезии и заживления ран. Более конкретно, настоящее изобретение относится к использованию для клеточной адгезии и заживления ран пептидов, содержащих одну или более копий 2-го и/или 4-го доменов fas-1 белка β ig-h3, где указанные 2-й и 4-й домены имеют высокую степень гомологии в двух аминокислотах, аспарагиновой кислоте и изолейцине, которые необходимы для связывания с интегрином, и таким образом опосредуют клеточную адгезию. Настоящее изобретение также относится к системе экспрессии пептидов, которые могут быть использованы для клеточной адгезии и заживления ран.

Предшествующий уровень техники β ig-h3 представляет собой белок внеклеточного матрикса, экспрессия которого индуцируется в различных клеточных линиях, включая клетки меланомы человека, эпителиальные клетки млекопитающего, кератиноциты и фибробласты легких, после передачи сигнала активным TGF- β (Skonier, J. et al., DNA Cell Biol. 13, 571, 1994). Ген β ig-h3 был впервые выделен путем скрининга методом дифференциальной гибридизации кДНК-библиотеки, созданной из клеточной линии аденокарциномы легких человека, которая была обработана TGF- β . Ген β ig-h3 кодирует белок из 683 аминокислот, который является в высокой степени консервативным у различных видов. Он содержит N-концевой секреторный сигнальный пептид и мотив Arg-Gly-Asp (RGD) у C-конца. Мотив RGD был обнаружен во многих белках внеклеточного матрикса, модулирующих клеточную адгезию, и служит в качестве лиганд-распознающей последовательности для некоторых интегринов (Stonier, J. et al., DNA Cell Biol. 11, 511, 1992).

Согласно некоторым исследованиям известно, что β ig-h3 участвует в росте и пролиферации клеток, в заживлении ран и в клеточной адгезии, хотя механизм, лежащий в основе этих функций, пока не известен. Однако очевидно, что β ig-h3 играет важную роль в морфогенезе и во взаимодействиях с клетками и белками внеклеточного матрикса в различных тканях.

В нескольких исследованиях были получены некоторые данные относительно роли β ig-h3 в опосредовании прикрепления и отделения клеток. Так, например, было обнаружено, что очищенный белок β ig-h3 стимулирует прикрепление и распределение фибробластов кожи, ингибируя, тем самым, адгезию клеток A549, HeLa и Wi-38 в бессывороточных средах. В частности, известно, что β ig-h3 обладает ингибирующей активностью, направленной против роста опухолевых клеток, и влияет на образование колоний и на морфологию клеток. Ингибирующая активность была продемонстрирована в работе, где указывается, что трансфекция β ig-h3-экспрессирующих плазмид в CHO (клетки яичника китайского хомячка) способствует заметному снижению пролиферации клеток и способности таких

клеток образовывать опухоли у "голых" (безтимусных) мышей. Кроме того, на основе обнаружения того факта, что применение фармацевтически эффективного количества β ig-h3 в рану позволяет клеткам, а в частности фибробластам, распределяться по поверхности раны и прикрепляться к ее участку, был разработан метод заживления ран. Следовательно, клеточно-адгезивная молекула β ig-h3, индуцированная TGF- β в различных клеточных линиях, играет очень важную роль в росте клеток, дифференцировке клеток, заживлении ран, морфогенезе и в клеточной адгезии (Rawe I.M. et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 38, 893, 1997; Lebaron R.G. et al., J. Invest. Dermatol. 104, 844, 1995).

β ig-h3 содержит четыре повтора из 140 аминокислот с внутренней гомологией, а именно в доменах fas-1. Домены с внутренними повторами имеют в высокой степени консервативные последовательности, обнаруженные в секреторных белках и в мембранных белках различных организмов, включая млекопитающих, насекомых, морских ежей, растений, дрожжей и бактерий. Примерами белков, содержащих указанную консервативную последовательность, являются периостин, фасцилин 1, HLC-2 морского ежа, CAM водорослей и MPB70 микобактерии. Консервативный домен в этих белках (обозначаемый далее "fas-1") состоит примерно из 110-140 аминокислот с двумя высококонсервативными ветвями, H1 и H2, каждая из которых имеет примерно 10 аминокислот (Kawamoto, T. et al., Biochem. Biophys. Acta. 1395, 288, 1998).

Четыре домена fas-1 были обнаружены в β ig-h3, периостине и в фасцилине I, два домена fas-1 были обнаружены в HLC-2, и только один домен fas-1 был обнаружен в MPB70. Хотя функции этих белков точно не выяснены, однако, известно, что некоторые из них действуют как клеточно-адгезивные молекулы. Так, например, сообщалось, что β ig-h3, периостин и фасцилин 1 опосредуют адгезию фибробластов, остеобластов и нервных клеток соответственно. Также сообщалось, что CAM водорослей представляет собой клеточно-адгезивную молекулу, присутствующую в эмбрионах водорослей Volvox (LeBaron, R.G. et al., J. Invest. Dermatol. 104, 844, 1995; Horiuchi, K. et al., J. Bone Miner. Res. 14, 1239, 1999; Huber O. et al., EMBO J. 13, 4212, 1994).

Во-первых, считалось, что клеточно-адгезивная активность β ig-h3 должна опосредоваться C-концевым мотивом RGD. Однако результаты некоторых исследований показали, что мотив RGD необязательно стимулирует распластывание (распределение по поверхности) хондроцитов, и что зрелый растворимый белок β ig-h3, у которого мотив RGD был делетирован в результате карбокси-концевого процессинга, способен ингибировать клеточную адгезию, что позволяет сделать вывод, что мотив RGD белка β ig-h3 не является обязательным для опосредования активности β ig-h3, обеспечивающей адгезию клеток. Кроме того, недавно сообщалось, что β ig-h3 стимулирует распластывание фибробластов посредством интегрин α 1 β 1,

а мотив RGD β ig-h3 не является обязательным для опосредования клеточно-адгезивной способности β ig-h3.

Недавно сообщалось, что β ig-h3 специфически связывается с интегрином, что приводит к усилению адгезии и расплывания клеток независимо от мотива RGD (Ohno S. et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1451, 196, 1999). Кроме того, было обнаружено, что консервативные пептиды H1 и H2 β ig-h3 не влияют на β ig-h3-опосредованную клеточную адгезию. В целом, эти результаты указывают на то, что аминокислоты, которые необходимы для обеспечения клеточно-адгезивной активности β ig-h3, присутствуют не только на участках H1 и H2, но и на других участках. Компьютерный поиск, проведенный на основе гомологии не только среди повторяющихся доменов fas-1 β ig-h3, но также и среди доменов fas-1 других белков, выявил, что, помимо пептидов H1 и H2, имеется несколько высококонсервативных кислот, что позволяет предположить о возможном участии этих консервативных аминокислотных последовательностей в адгезии клеток.

Известно, что из доменов β ig-h3, которые играют важную роль в клеточной адгезии, либо 2-й, либо 4-й домен идентифицируется как минимальный домен, необходимый для клеточной адгезии молекулы настоящего изобретения. На основе этих данных, рекомбинантные белки настоящего изобретения, содержащие необходимые функциональные домены, были также идентифицированы как белки, эффективные для заживления ран.

Недавно исследования по заживлению ран стали проводиться как методами клеточной биологии, так и методами молекулярной биологии, и стимуляция заживления ран находит все большее применение в различных областях клинической медицины. Однако механизмы заживления ран как с точки зрения клеточной биологии, так и с точки зрения молекулярной биологии остаются пока неизвестными. В соответствии с данными, полученными до настоящего времени, заживление раны является ответом ткани на травму, приводящим к восстановлению ткани посредством сложных биологических процессов, включая хемотаксис, дифференцировку и репликацию клеток, синтез матричных белков, ангиогенез и заживление ран (Steed D.L. et al., *Clin. Plast. Surg.* 25, 397, 1998).

Факторы роста представляют собой репрезентативные материалы, которые появляются на ранней стадии процесса заживления раны и регулируют последующий процесс заживления раны. Оказывая сильное влияние на все стадии заживления раны, факторы роста действуют как регуляторы роста, дифференцировки и метаболизма клеток, и способствуют реорганизации окружения раны благодаря своим хемотаксическим свойствам, обеспечивающим миграцию в область раны клеток различных типов, участвующих в воспалении и репарации ткани, в пролиферации клеток, в стимуляции ангиогенеза и в синтезе и деградации внеклеточного матрикса. PDGF фактор роста

тромбоцитов обеспечивает миграцию фибробластов в рану и стимулирует их пролиферацию, а трансформирующий фактор роста- β (TGF- β) стимулирует образование ими коллагена. PDGF обладает хемотаксическими свойствами для большинства клеток, участвующих в заживлении ран, стимулирует ангиогенез, ремодуляцию и сокращение, и активирует клетки, способствующие заживлению ран (Mustoe T.A. et al., *J. Clin. Invest.* 87, 694, 1991; Lepisto, J. et al., *Surg. Res.* 53, 596, 1992). EGF (эпидермальный фактор роста) стимулирует миграцию кератиноцитов, ангиогенез и развитие гранулированной ткани и активирует митогенез кератиноцитов и фибробластов (Franklin, J.D. et al., *Plast. Reconstr. Surg.* 64, 766, 1979; Buckley, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7340, 1985). bFGF (основной фактор роста фибробластов) стимулирует ангиогенез, эпителизацию и отложение коллагеновых волокон и ассоциируется с гепарином в различных формах для осуществления соответствующих функций (Tsuboi, R. et al., *J. Exp. Med.* 172, 245, 1990; Kinsnorth, A.N. et al., *Br. J. Surg.* 77, 409, 1990). IGF (инсулино-подобный фактор роста) усиливает дифференцировку клеток. VEGF (васкулярный эндотелиальный фактор роста) повышает проницаемость сосудов и стимулирует эндотелиальный митогенез.

Из факторов роста и цитокинов, участвующих в заживлении ран, наиболее репрезентативным является TGF- β . Этот цитокин, который существует в трех формах (TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3) у млекопитающих, играет важную роль в росте и дифференцировке различных клеток и обладает различными сложными функциями, включая регуляцию роста клеток, регуляцию иммунных ответов, стимуляцию остеогенеза, индуцирование специфических макромолекул хряща и стимуляцию заживления ран (Bennett, N.T. et al., *Am. J. Surg.* 165, 728, 1993). Считается, что TGF- β , обнаруживаемый в эпителии во время заживления раны, стимулирует экспрессию интегрин в кератиноцитах в процессе реэпителизации.

В недавних исследованиях, касающихся экспрессии TGF- β , было выявлено, что мРНК TGF- β 3 экспрессируется в эпителии нормальной кожи и в эпителии острых и хронических ран, тогда как мРНК TGF- β 1 не экспрессируется ни в нормальной коже, ни в хронических ранах, но экспрессируется в эпителиальном слое, регенерированном из острых ран, а мРНК TGF- β 2 не экспрессируется нигде (Schmid P. et al., *J. Pathol.* 171, 191, 1993). Исходя из этих эффектов, даже если их механизмы точно не установлены, можно предположить, что TGF- β играет важную роль в реэпителизации.

Экспрессия β ig-h3 активируется TGF- β , что дает основание предположить, что β ig-h3 участвует в опосредовании некоторых сигналов TGF- β . Сообщалось, что клетки CHO (яичника китайского хомячка), трансформированные β ig-h3-экспрессирующими плазмидами, обладают пониженной онкогенностью (Skonier J. et al., *DNA Cell. Biol.* 13, 571, 1994). В противоположность этому, экспрессия β ig-h3

ингибируется в обработанных дексаметазоном стволовых клетках, в некоторых опухолевых клетках и фибробластах, культивированных в участках поражения кожи, вызванного локализованным гиперостозом или мелореостозом. Также сообщалось, что β ig-h3 служит в качестве ингибитора остеогенеза (Genini M. et al., Int. J. Cancer 66, 571, 1996; Schenker T. et al., Exp. Cell. Res. 239, 161, 1998; Kim J. et al., J. Cell. Biochem. 77, 169, 2000). Помимо этих функций, β ig-h3, известный как клеточно-адгезивная молекула, стимулирует прикрепление и распластывание фибробластов в коже.

В исследованиях, касающихся распределения β ig-h3 в глазных тканях, сообщалось, что эта адгезивная молекула экспрессируется в эпителии роговицы у здоровых взрослых людей, в фетальных внутрироговичных стромальных клетках и в эндотелиальных и стромальных клетках в процессе заживления раны. Кроме того, β ig-h3 экспрессируется в юкстагломерулярном аппарате и в проксимальных канальцах почек, и его экспрессия усиливается при сахарном диабете. Кроме того, он был обнаружен в субэндотелиальной ткани гладкой мышцы коронарных артерий у здорового человека, а в случае артериосклероза его количество увеличивается в эндотелии кровеносных сосудов. Однако пока еще не установлено, происходит ли экспрессия β ig-h3 в нормальных кожных тканях и в кожных ранах. (Klintworth G.K. et al., Am. J. Pathol. 152, 743, 1998; Munier F.L. et al., Nature Genetics 15, 247, 1997; Streeten B.W. et al., Arch. Ophthalmol. Vis. Sci. 38, 893, 1997). Как приведено выше, распределение и экспрессия β ig-h3 в тканях здорового человека остаются пока неясными. В частности, пока не сообщалось каких-либо данных относительно характера экспрессии β ig-h3 в кожных ранах. Однако некоторые исследователи сообщали, что функции β ig-h3 заключаются в стимулировании адгезии и распределении кожных фибробластов, а поэтому предполагается, что они участвуют в стимуляции заживления ран.

Краткое описание изобретения

Исходя из предшествующего уровня техники было проведено интенсивное и тщательное исследование β ig-h3-опосредованной клеточной адгезии, которое было положено в основу настоящего изобретения, и которое привело к обнаружению того факта, что среди доменов fas-1 β ig-h3 и среди доменов fas-1 других пептидов, проанализированных посредством компьютерного поиска, существуют, помимо мотивов H1 и H2, высококонсервативные аминокислотные последовательности, и, в частности, последовательности, в которых была обнаружена высокая гомология в остатках аспарагиновой кислоты и изолейцина в положениях, близких к области H2. Кроме того, было обнаружено, что каждый из 2 и 4 доменов β ig-h3, содержащих консервативные аминокислотные остатки, индуцирует клеточную адгезию через интегрин α 3 β 1. Кроме того, рекомбинантные белки, которые

были сконструированы так, чтобы они имели 2-й и/или 4-й домен fas-1 β ig-h3, были идентифицированы как белки, идентичные белку β ig-h3 дикого типа в отношении активности, стимулирующей адгезию и распластывание клеток и заживление ран.

Поэтому целью настоящего изобретения является получение пептидов, которые содержат консервативные аминокислотные последовательности, необходимые для активности по прикреплению, распластыванию и отделению клеток и заживления ран.

Другой целью настоящего изобретения является использование этих пептидов для обеспечения клеточной адгезии и заживления ран.

Еще одной целью настоящего изобретения является получение экспрессирующей системы для этих пептидов.

Другой целью настоящего изобретения является разработка способа прикрепления клеток.

Еще одной целью настоящего изобретения является разработка способа заживления ран.

В соответствии с одним из аспектов, настоящее изобретение относится к рекомбинантному белку, включающему часть доменов β ig-h3, которые могут быть использованы для прикрепления клеток млекопитающих.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к экспрессирующим векторам p β ig-h3 D-II, p β ig-h3 D-IV и p β ig-h3 D-IV 4X, способным экспрессировать 2-й и 4-й домен fas-1 β ig-h3, соответствующий аминокислотам 237-377 и 498-637 соответственно.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к новым штаммам E.coli, трансформированным экспрессирующими векторами p β ig-h3 D-II, p β ig-h3 D-IV и p β ig-h3 D-IV 4X, идентифицированными как E.coli BL21/His β -g (регистрационный номер № KCTC 0905BP), E.coli BL21/His β -e (регистрационный номер № KCTC 0904BP) и E.coli BL21/His β -e4x (регистрационный номер № KCTC 0906BP) соответственно.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способу прикрепления клеток, включающему стадии: получения рекомбинантного белка, содержащего одну или более копий 2-го и/или 4-го домена β ig-h3 с использованием экспрессирующего вектора; покрытия рекомбинантным белком твердого носителя; и нанесения клеток на покрытый белком твердый носитель.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к использованию рекомбинантного белка для прикрепления клеток.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к использованию рекомбинантного белка для заживления ран.

В соответствии с еще одним своим аспектом, настоящее изобретение относится к способу заживления ран, включающему стадии: покрытия твердого носителя рекомбинантным белком, содержащим одну

или более копий 2-го и/или 4-го домена β ig-h3; прикрепления клеток кожи к твердому носителю и нанесения указанного твердого носителя на раны.

Краткое описание графического материала

На фиг.1 схематически представлена диаграмма, иллюстрирующая рекомбинантные белки β igh3-WT и β igh3- Δ RGD, где консервативные области показаны  и , а мотив RGD показан

®.

На фиг.2 представлена фотография, иллюстрирующая результаты электрофореза в ДСН-ПААГ рекомбинантных белков β igh3-WT и β igh3- Δ RGD.

На фиг.3 представлена микрофотография, иллюстрирующая влияние рекомбинантных белков β igh3-WT и β igh3- Δ RGD на адгезию и распластывание клеток HCE после окрашивания кристаллическим фиолетовым.

На фиг.4 представлены кривые, которые иллюстрируют зависимость от концентрации активности рекомбинантных белков β igh3-WT и β igh3- Δ RGD, стимулирующих адгезию и распластывание клеток HCE, как было измерено по количеству (А) и площади поверхности (В) прикрепленных клеток.

На фиг.5 представлены гистограммы, в которых сравниваются активности рекомбинантных белков β igh3-WT и β igh3- Δ RGD, стимулирующих адгезию клеток HCE, как было определено по количеству (А) и площади поверхности (В) прикрепленных клеток.

На фиг.6а представлена гистограмма, иллюстрирующая влияние различных соединений на активности рекомбинантных белков β igh3-WT и β igh3- Δ RGD, стимулирующих адгезию клеток HCE.

На фиг.6b представлена гистограмма, иллюстрирующая влияние двухвалентных катионов на активности рекомбинантного белка β igh3-WT, стимулирующего адгезию клеток HCE.

На фиг.6с представлена гистограмма, иллюстрирующая ингибирующее действие моноклонального антитела против интегрина на активность рекомбинантного белка β igh3-WT, стимулирующего адгезию клеток HCE.

На фиг.6d представлена гистограмма, иллюстрирующая ингибирующее действие моноклонального антитела против интегрина на активность различных белков, стимулирующих адгезию клеток HCE.

На фиг.6е представлена гистограмма, иллюстрирующая адгезионную специфичность клеток K562 по отношению к рекомбинантному белку β igh3-WT и матричным белкам.

На фиг.7 представлена диаграмма, иллюстрирующая рекомбинантные белки, каждый из которых имеет домены fas-1 β ig-h3.

На фиг.8 представлена фотография, иллюстрирующая электрофорез в ДСН-ПААГ рекомбинантных белков, содержащих домены fas-1 β ig-h3.

На фиг.9 представлена гистограмма, иллюстрирующая активность рекомбинантных белков, содержащих домены fas-1 β ig-h3, в отношении адгезии клеток HCE.

На фиг.10 представлена гистограмма, иллюстрирующая ингибирующее действие антител против интегрина на активности рекомбинантных белков, содержащих домены fas-1 β ig-h3, в отношении адгезии клеток HCE.

На фиг.11 представлены части аминокислотных последовательностей различных матричных белков, содержащих домены fas-1.

На фиг.12 представлена диаграмма, иллюстрирующая мутанты, имеющие замены в 4-ом домене β ig-h3.

На фиг.13 представлена фотография, иллюстрирующая результаты электрофореза в ДСН-ПААГ рекомбинантных мутантов, имеющих замены в 4-ом домене β ig-h3.

На фиг.14 представлена гистограмма, иллюстрирующая клеточно-адгезивную активность мутантов, имеющих замены в 4-ом домене β ig-h3.

На фиг.15 представлена диаграмма, иллюстрирующая рекомбинантные белки β igh3-D-IV, β igh3-D-IV 2X, 3X и 4X, содержащие одну, две, три и четыре копии 4-го домена β ig-h3.

На фиг.16 представлены фотографии, иллюстрирующие рекомбинантные белки β igh3-D-IV, β igh3-D-IV 2X, 3X, и 4X, которые были подвергнуты электрофорезу в 10% ДСН-ПААГ (А) и в 8% неденатурирующем ПААГ (В) и которые были очищены на агарозной смоле Ni-NTA.

На фиг.17 представлены полученные на оптическом микроскопе фотографии ран, на которые наносили только мазевую основу (А) и мазевую основу в комбинации с фибронектином (В), His- β -b (С) и β ig-h3-D-IV (D).

На фиг.18 представлены микрофотографии ран, которые находятся на стадии реэпителизации после обработки только мазевой основой (А) и мазевой основой в комбинации с фибронектином (В), His- β -b (С) и β ig-h3-D-IV (D).

На фиг.19 представлены полученные на оптическом микроскопе фотографии ран, которые имели коллагеновые волокна, образованные после обработки только мазевой основой (А) и мазевой основой в комбинации с фибронектином (В), His- β -b (С) и β ig-h3-D-IV (D).

На фиг.20 представлена гистограмма, иллюстрирующая адгезивные активности рекомбинантных белков β igh3-D-IV, β igh3-D-IV 2X, 3X и 4X, содержащих, по крайней мере, одну копию 4-го домена β ig-h3 по отношению к клеткам HCE.

На фиг.21 представлены полученные на оптическом микроскопе фотографии ран, площади которых уменьшались после обработки только хитозановой основой (А) и хитозановой основой в комбинации с фибронектином (В), β ig-h3 3X (С) и β ig-h3 4X (D).

Подробное описание изобретения

В соответствии с настоящим изобретением, рекомбинантные белки получают на основе 2-го и 4-го доменов fas-1 β ig-h3 и используют как отдельно, так и в комбинации, для достижения адгезии и распластывания клеток. Для отбора 2-го и 4-го доменов идентифицировали домены β ig-h3, которые обладают

активностью в отношении адгезии и распластывания клеток. В этих целях С-концевую последовательность Arg-Gly-Asp (RGD), известную как лиганд-распознающую последовательность для некоторых интегринов, оценивали на ее влияние на клеточно-адгезивную способность β ig-h3. Активность прикрепления клеток измеряли по числу и площади поверхности прикрепленных клеток. В результате этого было обнаружено, что β ig-h3 стимулирует адгезию и распластывание клеток независимо от мотива RGD.

На основании этих данных были использованы химические реагенты для исследования специфичности клеточно-адгезивной активности β ig-h3 и для получения дополнительной информации, которая послужила бы ключом для выявления природы поверхностного клеточного рецептора для β ig-h3. Данные, полученные благодаря использованию таких химических реагентов, дают основание предположить, что поверхностным клеточным рецептором для β ig-h3, опосредующим клеточно-адгезивную активность β ig-h3, может быть один из RGD-зависимых интегринов, которым для взаимодействия с β ig-h3 требуется присутствие двухвалентных катионов.

Затем, для идентификации минимальных доменов, имеющих важное значение для клеточно-адгезивной функции β ig-h3, была проведена оценка способности каждого домена fas-1 опосредовать клеточную адгезию.

Эту оценку проводили на основании того факта, что домены fas-1 были обнаружены в различных клеточно-адгезивных молекулах, таких как β ig-h3, периостин, фасциклин I, HLC-2 и CAM водорослей, а число доменов fas-1, присутствующих в таких адгезивных молекулах, варьируется для различных белков. Этот факт позволяет сделать вывод, что для клеточно-адгезивной активности β ig-h3 не требуется присутствия всех четырех доменов fas-1, а в исключительном случае клеточно-адгезивную активность β ig-h3 может опосредовать лишь один домен fas-1. В соответствии с настоящим изобретением было выявлено, что для обеспечения клеточно-адгезивной функции β ig-h3 достаточно присутствия 2-го или 4-го домена fas-1 β ig-h3. Эти результаты приводят к заключению, что последовательности H1 и H2, которые являются общими в данных четырех доменах β ig-h3, не имеют важного значения для опосредования клеточно-адгезивной активности β ig-h3. Кроме того, было обнаружено, что две аминокислоты, то есть аспарагиновая кислота и изолейцин, находящиеся в положениях, близких к области H2 во 2-м и 4-м доменах fas-1, являются в высокой степени консервативными, что указывает на то, что такие аминокислотные остатки составляют мотив, ассоциированный с клеточной адгезией. Необходимость присутствия двух консервативных аминокислот для клеточной адгезии была установлена с использованием мутантов, имеющих замены в 4-ом домене fas-1 β ig-h3.

В другом варианте осуществления,

настоящее изобретение относится к способу заживления ран, в котором используются 2-й и 4-й домены fas-1 β ig-h3, отдельно или в комбинации.

5 Было проведено сравнение влияния на заживление ран мутантных белков β ig-h3, содержащих лишь домены, которые являются активными в отношении клеточной адгезии, и домены β ig-h3 дикого типа (β igh3-WT), которые содержат часть данных доменов. Для 10 этого рекомбинантные белки, содержащие домены, которые являются активными в отношении клеточной адгезии, были введены крысам.

При использовании рекомбинантного белка, содержащего 4-й домен fas-1 β ig-h3, 15 в качестве фармацевтически эффективного ингредиента для мази, наблюдалось затягивание раны, а также реэпителизация и образование коллагеновых волокон. И наконец, эти результаты свидетельствуют о том, что один 2-й или 4-й домен fas-1 β ig-h3, 20 в котором присутствуют консервативные аспарагиновая кислота и изолейцин, может быть использован для лечения ран, а следовательно, он может быть использован для разработки терапевтических средств для 25 лечения ран.

Кроме того, превосходная клеточная адгезия и заживление ран были достигнуты с использованием рекомбинантного белка, содержащего 2-й домен fas-1 β ig-h3 или 2-й и 4-й домены.

30 По сравнению с белком, содержащим все такие домены, рекомбинантные белки, содержащие часть таких доменов, имеют то преимущество, что они могут быть продуцированы в больших количествах, поскольку они синтезируются в водорастворимых формах, а поэтому не 35 подвергаются денатурации.

Примеры

Для лучшего понимания настоящего изобретения ниже приводятся примеры, 40 которые представлены лишь для иллюстрации и не ограничивают объема настоящего изобретения.

Пример 1

Идентификация клеточно-адгезивной активности RGD-независимых белков β ig-h3 45 1-1: Продуцирование рекомбинантного белка β ig-h3

Для выявления доменов β ig-h3, которые фактически обладают активностью, обеспечивающей адгезию и распластывания 50 клеток, С-концевую последовательность Arg-Gly-Asp (RGD), известную как лиганд-распознающая последовательность для некоторых интегринов, оценивали на ее влияние на клеточно-адгезивную способность β ig-h3. Для этого получали RGD-делетированный рекомбинантный 55 белок β ig-h3 (β igh3- Δ RGD) и рекомбинантный белок β ig-h3 дикого типа (β igh3-WT).

Сначала полноразмерную кДНК β ig-h3 человека, клонированную в pBluescript (pBs β ig-h3), расщепляли ферментами NdeI и BglII. ДНК-фрагмент субклонировали в 60 EcoRV-EcoRI-сайт pET-29b(+) (Novagen Inc.). β igh3-WT получали путем введения NcoI-фрагмента длиной 1351 п.н., вырезанного из кДНК β ig-h3, в NcoI-сайт этого клона. β igh3- Δ RGD получали

из β igh3-WT путем вырезания 3'-фрагмента плазмиды β igh3-WT ферментами AocI и NotI с последующим затуплением концов и самолигированием, как показано на фиг.1.

После трансформации каждой рекомбинантной плазмиды E.coli BL 21 DE3 культивировали в среде LB, содержащей 50 мкг/мл канамицина при 37°C до достижения оптической плотности (OD) 0,5-0,6 при 595 нм. Рекомбинантные белки β ig-h3 индуцировали с использованием 1 mM изопропил- β -D-(-)-тиогаляктопиранозидом (IPTG) при 37°C в течение 3 часов. Полученный таким образом осадок ресуспендировали в буфере для лизиса (50 mM Трис-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% тритон X-100, 1 mM PMSF, 0,5 mM DTT), а затем обрабатывали ультразвуком. Тельца включения растворяли в денатурирующем буфере, содержащем 8M мочевины с 20 mM, а затем денатурированные белки очищали на смоле Ni-NTA (Qiagen). Рекомбинантные белки элюировали 200 mM раствором имидазола, а затем последовательно диализовали, начиная с высоких и кончая низкими концентрациями мочевины в 20 mM Трис-HCl-буфере, содержащем 50 mM NaCl. Эти рекомбинантные белки анализировали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, как показано на фиг.2.

1-2: Анализ на клеточно-адгезивную активность рекомбинантных белков в домене fas-1 β ig-h3

Эпителиальные клетки роговицы человека (HCE), используемые в данном анализе, культивировали в среде DMEM (EMEM/F-12, Gibco BRL), в которую добавляли 15% фетальную бычью сыворотку, гентамицин (40 мкг/мл), инсулин (5 мкг/мл), холерный токсин (0,1 мкг/мл) и эпидермальный фактор роста человека (hEGF) при 37°C в 5% CO₂.

Анализ на клеточную адгезию осуществляли следующим образом.

Сначала обеспечивали адгезию рекомбинантных белков β ig-h3 или других белков внеклеточного матрикса ко дну 96-луночного микротитрационного планшета (Falcon) путем инкубирования при 37 °C в течение 1 часа и блокировали с использованием PBS, содержащем 0,2% БСА (BSA). Белками внеклеточного матрикса для покрытия дна были витронектин плазмы человека (Promega), очищенный фибронектин плазмы человека (pFN), куриный коллаген типов I и II (Chemicon International Inc.), бычий коллаген типов IV и VI (Chemicon), мышинный ламинин (Chemicon) и бычий сывороточный альбумин (BSA)(Sigma). Клетки трипсинизировали и суспендировали в культуральных средах при плотности 2×10^5 клеток на 1 мл. В каждую лунку планшетов, покрытых рекомбинантными белками, добавляли 0,1 мл клеточной суспензии.

После инкубирования при 37°C в течение 1 часа неприкрепленные клетки удаляли путем промывки PBS. Прикрепленные клетки инкубировали в течение 1 часа при 37°C в 50 mM цитратном буфере, pH 5,0, содержащем 3,75 mM

п-нитрофенол-N-ацетил-1- β -D-глизозаминаида в качестве субстрата для гексозаминаидазы и 0,25% тритона X-100, а затем добавляли 50

мМ глицинового буфера, pH 10,4, содержащего 5 mM EDTA для блокирования ферментативной активности. Измерения оптической плотности при 405 нм проводили в микропланшет-ридере Multiscan MCC/340.

Для определения площади клеточной поверхности как показателя

клеточно-адгезивной активности

4×10^4 клеток наносили на субстраты в 48-луночных планшетах для культивирования.

Прикрепленные клетки фиксировали 8% глутаральдегидом (Sigma), а затем

окрашивали 0,25% кристаллическим фиолетовым (Sigma) в 20% метаноле.

Измерения площади клеточной поверхности осуществляли с помощью программы

Image-Pro плюс (Media Cybernetics). Эксперименты проводили с тремя

повторностями с 200 или 300 измерениями на один участок для каждого эксперимента.

Данные выражали как среднюю площадь в определенных промежутки

времени $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Результаты измерений активности в отношении адгезии и распластывания клеток

с использованием β igh3-WT и β igh3- Δ RGD показали, что число и площадь поверхности

клеток HCE, прикрепленных к β igh3-WT, явно превышали число и площадь поверхности

клеток, прикрепленных к альбумину, служащему в качестве негативного контроля,

и эти параметры были сравнимыми с параметрами для клеток, прикрепленных к

фибронектину, как показано на фиг.3. Активность β ig-h3, по клеточной адгезии и

распластыванию, была зависимой от концентрации, как показано на фиг.4A и

4B. β igh3- Δ RGD, у которого отсутствовал мотив RGD, обнаруживал почти аналогичную

эффективность в отношении адгезии и распластывания клеток (фиг.5A и 5B). В

целом, эти результаты подтверждают, что β ig-h3 способствует адгезии и

распластыванию клеток независимо от мотива RGD.

Экспериментальный пример 1

Идентификация клеточного поверхностного рецептора β ig-h3,

опосредующего клеточно-адгезивную активность β ig-h3

1-1: Идентификация клеточно-адгезивной активности с использованием матриксного

пептида и реагента

Для идентификации клеточных поверхностных рецепторов, опосредующих

клеточно-адгезивную активность белка β ig-h3 осуществляли анализ на

ингибирование с использованием различных реагентов.

Сначала пластиковые чашки для культивирования покрывали 10 мкг/мл

фибронектина, β igh3-WT или β igh3- Δ RGD. Клетки HCE предварительно инкубировали в

течение 30 минут в средах, содержащих 5 mM EDTA, 100 мкг/мл β igh3-WT, 100

мкг/мл β igh3- Δ RGD, 1 mM RGD, 1 mM RGE или 100 мкг/мл фибронектина, либо не

содержащих ни одного из этих компонентов, а затем анализировали на клеточную адгезию,

как описано в примере 1.

Адгезия клеток к β ig-h3 значительно ингибировалась самим β ig-h3, пептидом RGD и EDTA и частично ингибировалась

фибронектином и EGTA, но не ингибировалась пептидом RGE. Адгезия клеток к фибронектину также значительно ингибировалась самим фибронектином, пептидом RGD и EDTA и частично ингибировалась β ig-h3 и EGTA, но не ингибировалась пептидом RGE, как показано на фиг.6A. Эти результаты показали, что клеточным поверхностным рецептором для β ig-h3, опосредующим клеточно-адгезивную активности β ig-h3 может быть один из RGD-зависимых интегринов.

1-2: Влияние двухвалентных катионов на клеточно-адгезивную активность

Для анализа

чувствительности β ig-h3-опосредованной адгезии к двухвалентному катиону клетки суспендировали в HEPES-забуференном физиологическом растворе (HBS) (150 mM NaCl, 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, pH 7,4) при плотности 2×10^5 клеток/мл и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем их дважды промывали в HBS и ресуспендировали в том же буфере. Аликвоты клеток (50 мкл) добавляли в лунки планшетов для микрокультивирования и инкубировали в течение 30 мин при 37°C в 5% CO₂-атмосфере повышенной влажности с 50 мкл аликвот HBS, содержащего двухвалентные катионы (MnCl₂, MgCl₂ или CaCl₂) при концентрации, в два раза превышающей конечную концентрацию. Затем клетки высевали на покрытые лигандом чашки для проведения анализа на адгезию.

Адгезия клеток к β ig-h3 сильно стимулировалась Mn²⁺ и в меньшей степени Mg²⁺, но лишь маргинально Ca²⁺, как показано на фиг.6B. В целом, эти результаты продемонстрировали, что клеточный поверхностный рецептор для β ig-h3 представляет собой рецептор типа RGD-зависимого интегрин, который для взаимодействия с β ig-h3 требует присутствия двухвалентных катионов.

1-3: Идентификация клеточного поверхностного рецептора β ig-h3 с использованием моноклонального антитела против интегрин

Для идентификации рецепторов для β ig-h3 блокирующие функцию моноклональные антитела против субъединиц интегрин оценивали на их влияние на адгезию клеток HCE к поверхности, покрытой β ig-h3. Для этого сначала HCE (3×10^5 клеток/мл) предварительно инкубировали при 37°C в течение 30 мин в инкубационном растворе в присутствии каждого из моноклональных антител (5 мкг/мл) против интегринов различных типов. Предварительно инкубированные клетки переносили на планшеты, предварительно покрытые белками β ig-h3, а затем дополнительно инкубировали при 37°C в течение 1 часа и проводили количественный анализ на связывание β ig-h3 с субстратом для гексозаминидазы. Величины выражали как процент числа клеток, прикрепленных к β ig-h3, в отсутствие моноклональных антител.

Адгезия к β ig-h3-покрытой поверхности

специфически ингибировалась антителом против субъединицы α 3. Поскольку субъединица α 3 интегрин, как известно, связывается с субъединицей β 1 интегрин, то антитело против β 1 значительно блокирует адгезию клеток к β ig-h3, как показано на фиг.6C. Аналогичные результаты были получены с использованием клеток HT1080.

В контрольном эксперименте для блокирующих функцию антител, в качестве субстратов использовали фибронектин, витронектин, ламинин и коллаген типа I. Клетки HCE предварительно инкубировали с блокирующими функцию моноклональными антителами против субъединиц интегрин, а затем переносили на лунки, покрытые 10 мкг/мл фибронектина, витронектина, коллагена типа I или ламинина. После инкубирования анализировали число прикрепленных клеток.

Было показано, что адгезия клеток к фибронектину явно ингибируется антителами против интегринов α 3 и α 5. Адгезия к витронектину и коллагену типа I блокировалась антителами против интегринов α v и α 2 соответственно, тогда как адгезия клеток к ламинину ингибировалась антителами против интегринов α 3 и α 6, как показано на фиг.6D. С другой стороны, антитело против интегрин β 1 эффективно ингибировало адгезию клеток ко всем приведенным выше лигандам.

Для другого контрольного эксперимента были использованы клетки K562, которые, как известно, экспрессируют интегрин α 5, но не α 3. Клетки K562 инокулировали на планшеты, покрытые β ig-h3-WT, фибронектином, ламинином или коллагеном типа I, и инкубировали в течение 1 часа, а затем проводили анализ на гексозаминидазу. Клетки K562 не прикреплялись к β ig-h3, но прикреплялись к фибронектину и витронектину. В целом, эти результаты позволяют предположить, что α 3 β 1-интегрин является специфическим рецептором для β ig-h3 в клетках HCE, как показано на фиг.6E.

Пример 2

Идентификация доменов, необходимых для клеточно-адгезивной активности

В попытке идентифицировать аминокислоты, необходимые для клеточно-адгезивной активности β ig-h3, были проведены исследования для того, чтобы определить, способен ли каждый повторяющийся домен опосредовать клеточную адгезию.

Было получено четыре рекомбинантных белка, соответствующих четырем повторяющимся доменам: четыре фрагмента кДНК β ig-h3, кодирующих аминокислоты 129-241, 237-377, 368-506 и 498-637 соответственно, были амплифицированы посредством ПЦР и клонированы в EcoRV-XhoI-сайт pET-29b(+), и полученные четыре экспрессирующих вектора, обозначенных β ig-h3 D-I, β ig-h3 D-II, β ig-h3 D-III и β ig-h3 D-IV, использовали для получения рекомбинантных белков, как показано на фиг.7. Трансформанты E.coli с экспрессирующими векторами β ig-h3 D-II и β ig-h3 D-IV были обозначены E.coli BL21/His β -g и E.coli BL21/His β -e и

депонированы в Корейской коллекции типовых культур Корейского научно-исследовательского института биологических наук и биотехнологии (KRIBB) под регистрационными номерами KTCT 0905BP и KTCT 0904BP, соответственно, 4 декабря 2000 г.

Экспрессию и очистку рекомбинантных белков pig-h3 D-I, pig-h3 D-II, pig-h3 D-III и pig-h3 D-IV осуществляли в соответствии с процедурой, описанной в примере 1-1, и их идентификацию проводили методом электрофореза в ДСН-ПААГ, как показано на фиг.8.

Что касается опосредования клеточной адгезии, то 2-й и 4-й домены fas-1 обладали активностью, аналогичной активности pig-h3 дикого типа, тогда как 1-й домен fas-1 имел слабую активность, а 3-й домен fas-1 вообще не обладал такой активностью, как показано на фиг.9.

В экспериментах с блокирующими функцию антителами против субъединиц интегрин клеточная адгезия, опосредованная 2-м и 4-м доменом fas-1, почти полностью блокировалась антителами против α 3- и β 1-интегринов, что позволяет предположить, что 2-й и 4-й домены fas-1 имеют аминокислоты, необходимые для взаимодействия с α 3 β 1-интегрином, как показано на фиг.10. Эти результаты также позволяют сделать вывод, что последовательности H1 и H2 не опосредуют клеточно-адгезивную активность pig-h3, поскольку 1-й и 3-й домены fas-1 не обладают клеточно-адгезивной активностью, хотя они содержат последовательности H1 или H2.

Пример 3

Идентификация консервативной аминокислотной последовательности, необходимой для клеточно-адгезивной активности pig-h3

3-1: Идентификация консервативного мотива путем сопоставления аминокислотных последовательностей

Для обнаружения аминокислотной последовательности, ответственной за клеточную адгезию, во 2-м и 4-м доменах fas-1 pig-h3, которые независимо обладают клеточно-адгезивной активностью, проводили основанный на гомологии компьютерный поиск не только среди повторяющихся доменов fas-1 pig-h3, но также и среди доменов fas-1 других белков. В результате этого было обнаружено, что две аминокислоты, аспарагиновая кислота и изолейцин, расположенные возле области H2, являются в высокой степени консервативными для различных белков, как показано на фиг.11. Кроме того, было обнаружено, что аспарагиновая кислота и изолейцин являются консервативными во 2-м и 4-м доменах fas-1 pig-h3, которые обладают высокой клеточно-адгезивной активностью, хотя в 1-м домене fas-1 консервативной является только аспарагиновая кислота, которая обнаруживает промежуточную клеточно-адгезивную активность. Что касается 3-го домена fas-1, который не обнаруживает клеточно-адгезивной активности, то он не содержит ни одной из двух данных аминокислот. Этот факт, кроме того, свидетельствует о том, что остатки аспарагиновой кислоты и изолейцина,

находящиеся возле области H2, необходимы для опосредования активности, способствующей прикреплению и распластыванию клеток.

3-2: Идентификация клеточно-адгезивной активности консервативной аминокислотной последовательности с использованием мутантов, имеющих замены

Для дополнительного подтверждения того, что указанные две аминокислоты необходимы для клеточной адгезии, рекомбинантный белок, содержащий 4-й домен fas-1 pig-h3, был мутирован путем замены, как показано на фиг.12. Имеющий замены мутант pig-h3 D-II получали посредством ПЦР, и его последовательность подтверждали путем секвенирования оснований. Мутантный белок выделяли и очищали, как описано в примере 1-1, и подтверждали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ, как показано на фиг.13.

Проводили оценку клеточно-адгезивной активности мутантных белков, где Pro616, Asp617 и Ile618 pigh3 D-IV были, в совокупности, заменены на Ser, Ala и Ser соответственно. Было обнаружено, что мутантный белок, имеющий Ala вместо Asp617 и обозначенный D617A (pigh3 D-IV-Pal), и мутантный белок, имеющий Ser вместо Ile618 и обозначенный I618S (pigh3 D-IV-PDs), значительно блокировали клеточную адгезию, тогда как мутантный белок, имеющий Ser вместо Pro616 и обозначенный P616S (pigh3 D-IV-sDI), не оказывал влияния на клеточно-адгезивную активность. Что касается мутантного белка, в котором были мутированы три аминокислоты и который был обозначен P616S/D617A/I618S (pigh3 DIV-sas), то он также блокировал клеточную адгезию, как показано на фиг.14.

Почти полная потеря клеточно-адгезивной активности, опосредуемой 1-м доменом fas-1, в 1-м домене fas-1, имеющем мутацию в Asp617 и Ile618, подтверждает, что аспарагиновая кислота в положении 617 и изолейцин в положении 618 играют очень важную роль в опосредовании клеточно-адгезивной активности pig-h3.

Пример 4

Идентификация доменов pig-h3, влияющих на заживление ран

4-1: Экспрессия и очистка рекомбинантного белка pig-h3

Для того, чтобы определить, только ли домены pig-h3, которые обладают клеточно-адгезивной активностью, обнаруживают ту же самую эффективность в заживлении ран, что и нативный pig-h3, содержащий все четыре домена fas-1, были получены различные рекомбинантные белки pig-h3, показанные на фиг.15:

His- β -b, содержащий все 4 домена fas-1; pigh3 D-IV, содержащий только 4-й домен; и pigh3 D-IV 2X, 3X и 4X, каждый из которых включал, по крайней мере, один 4-й домен. Убедившись в том, что они имеют такую же клеточно-адгезивную активность, как и pigh3-WT, полученный в примере 1, получали рекомбинантный белок pig-h3, обозначенный His- β -b, из рекомбинантного экспрессирующего вектора pET-29 β , у которого в EcoRV-EcoRI-сайте находился Asp718-BgIII-фрагмент, полученный путем

делеции определенной аминоконцевой области из кДНК $\rho\text{ig-h3}$. Рекombинантные белки His- β -b и $\rho\text{igh3 D-IV}$ экспрессировали и очищали способами, описанными в примерах 1-1 и 3.

Рекombинантные белки, содержащие, по крайней мере, один 4-й домен, такой как $\rho\text{igh3 D-IV 2X}$, 3X и 4X, получали следующим образом. ДНК-фрагмент, кодирующий аминокислоты 498-637, соответствующие 4-му домену, получали с помощью ПЦР, и ПЦР-продукты затупляли по концам ферментом Кленова. Затупленный по концам кДНК-фрагмент встраивали в EcoRV-сайт $\rho\text{ig-h3 D-IV}$, который содержал 4-й домен $\rho\text{ig-h3}$, и полученный экспрессирующий вектор обозначали $\rho\text{b1-h3 D-IV 2X}$. Вставку $\rho\text{ig-h3 D-IV 2X}$ вырезали путем расщепления ферментами EcoRV и XhoI, и затупляли по концам путем обработки ферментом Кленова, а затем затупленный по концам фрагмент встраивали в EcoRV-сайты $\rho\text{ig-h3 D-IV}$ и $\rho\text{ig-h3 D-IV 2X}$. Полученные экспрессирующие векторы обозначали $\rho\text{ig-h3 D-IV 3X}$ и $\rho\text{ig-h3 D-IV 4X}$.

Экспрессию всех рекombинантных белков индуцировали в течение 3 часов в присутствии 1 mM IPTG и выделяли с использованием смолы Ni-NTA (Qiagen). Выделенные рекombинантные белки очищали путем элюирования 20 mM Трис-HCl, содержащим 50 mM NaCl и 300 mM имидазола. $\rho\text{ig-h3 D-IV 2X}$, 3X и 4X могут быть продуцированы в больших количествах, поскольку они были синтезированы в растворимых формах, в отличие от рекombинантных белков $\rho\text{ig-h3}$, содержащих все четыре домена и не подвергнутых денатурации, как показано на фиг.16А. Электрофорез с использованием неденатурирующего геля выявил, что $\rho\text{ig-h3 D-IV}$ не образует полимеров, тогда как 2X частично образует полимеры, а 3X и 4X легко образуют полимеры, как показано на фиг.16В.

E.coli BL21/His β -e 4X, который несет экспрессирующий вектор $\rho\text{ig-h3 D-IV 4X}$, содержащий четыре копии 4-го домена $\rho\text{ig-h3}$, был депонирован в Корейской коллекции типовых культур Корейского научно-исследовательского института биологических наук и биотехнологии (KRIBB) под регистрационным номером KTCT 0906BP 4 декабря 2000 г.

Фибронектин, служащий в качестве позитивного контроля, очищали из цитратсодержащей крысиной плазмы с помощью аффинной хроматографии с использованием желатина-сефарозы 4В. Плазму фильтровали при комнатной температуре через незамещенную сефарозу 4В и элюат загружали на желатин-сефарозу 4В, уравновешенную 0,05 М Трис-HCl, содержащим 0,05 М EACA (ϵ -аминокапроновая кислота), 0,02М цитрат натрия и 0,02% азида натрия. После элюирования большинство белков плазмы промывали буфером, содержащим 1М хлорид натрия. После этого абсорбированный фибронектин элюировали изотоническим буфером с 3М мочевиной кислотой, а затем последовательно диализовали против PBS, pH 7,2, в течение 48 часов для очистки фибронектина. Его концентрацию определяли по УФ-поглощению при 280 нм и

лиофилизировали, а затем хранили при -20°C .

4-2: Анализ на заживляющую рану активность $\rho\text{igh3 D-IV}$, содержащего 4-й домен

Для сравнения заживляющей раны активности рекombинантного $\rho\text{ig-h3}$, обозначенного His- β -b, который, подобно нативному белку $\rho\text{ig-h3}$ содержит все четыре домена fas-1, и рекombинантного $\rho\text{ig-h3}$, обозначенного $\rho\text{igh3-D-IV}$, который содержит только 4-й домен, анализировали основы для мазей, содержащие указанные рекombинантные белки, описанные ниже.

На спинках крыс делали четыре раны в неповрежденном дермальном слое, каждая диаметром 2 см, и крыс распределяли по тест-группам 1-A, 1-B, 1-C и 1-D в соответствии с наносимой на них мазью.

1-A: покрывали в дозе 1 г в день мазевой основой, не содержащей никаких материалов.

1-B: покрывали мазью в дозе 1 г в день, которая содержала фибронектин в концентрации 100 мкг/мл в сочетании с мазевой основой.

1-C: покрывали мазью в дозе 1 г в день, которая содержала белок His β -b в концентрации 100 мкг/мл в сочетании с мазевой основой.

1-D: покрывали мазью в дозе 1 г в день, которая содержала белок $\rho\text{igh3 D-IV}$ в концентрации 100 мкг/мл в сочетании с мазевой основой.

Спинки обработанных эфиром крыс выбривали, а затем выбритый участок стерилизовали раствором бетадина. В тест-группе 1 спинку каждой крысы надрезали лезвием хирургического скальпеля №15 с образованием четырех круглых ран диаметром 2 см, которые проникали во внутрь цельных дермальных слоев. Мази для тест-групп 1-A, 1-B, 1-C и 1-D наносили в количестве примерно 1 г на рану, на которую затем накладывали синтетическую повязку (Tegaderm® 3M) и слегка стягивали. Нанесение мазей осуществляли ежедневно один раз в день.

Что касается основы из водного материала (основа SamA), то каждая из мазей содержала на 1 г 38 мг спермацетов, 116 мг стеарилового спирта, 38 мг полиэтиленгликоля, 192 мг концентрированного глицерина, 23 мг этанола, 1 мг лаурилсульфата натрия, 0,87 мг этилпараоксибензоата, 0,12 мг бутилпараоксибензоата и очищенную воду.

Сначала наблюдали морфологию ран. Возле каждой раны была установлена та же самая шкала и изображения делали на одном и том же расстоянии от раны. Изображения сканировали на компьютере и использовали для измерения площади ран с помощью системы анализа изображения NIH (Bio-Optics). Для получения изображения мышцы крыс подвергали полной релаксации путем обработки крыс эфиром. Измерения проводили через день вплоть до 22-го дня. Для сравнения тест-групп измеренные величины анализировали в соответствии с анализом ANOVA и критерием Шеффе.

Во всех тест-группах наблюдалось постепенное уменьшение площади ран сразу после их образования. Было отмечено, что у тест-групп, которые были обработаны фибронектином и рекombинантным белком $\rho\text{ig-h3}$, площадь раны уменьшалась

быстрее, чем у тест-групп, которые были обработаны мазевой основой. Значительное уменьшение площади раны наблюдалось через 7 дней после нанесения мази. Статистически, наблюдались значимые различия ($p < 0,05$) между ранами группы 1-А и другими группами, которые не обнаруживали значимых различий.

Результаты представлены в табл.1 и на фиг.17.

Гистологический анализ проводили с помощью оптического микроскопа. Биопсию раневых участков брали на дни 3, 7, 10, 14 и 20, фиксировали в 10% формалине и отверждали парафином. Перед наблюдением под микроскопом 6 мкм-срезы образцов окрашивали гематоксилином-эозином (H&E) и трихромом Мессона. Зависимое от времени заживляющее действие на раны для каждого тестируемого материала оценивали по реэпителизации и образованию коллагеновых волокон. В случае реэпителизации, образование эпителия подвергали полуколичественной оценке, где оценка "ноль" соответствовала отсутствию образования эпителиальных слоев, оценка 1+ соответствовала инициации эпителизации, оценка 2+ соответствовала неполной структуре эпителиального слоя, а оценка 3+ соответствовала полной структуре эпителиального слоя. Что касается сравнения тест-групп и временных различий для каждой группы, то был проведен статистический анализ измеренных величин в соответствии с критерием ANOVA и критерием Шеффе. Что касается образования коллагенового волокна, то его оценивали по шкале, где 1+ означает незначительное образование коллагеновых волокон, наблюдаемое при использовании трихромового красителя, 2+ означает разрозненные коллагеновые волокна, а 3+ означает плотные коллагеновые волокна.

Как наблюдалось с помощью оптического микроскопа, реэпителизация начиналась в дни 7-10 в тест-группах 1-В, 1-С и 1-Д, и завершалась на день 20. С другой стороны, в случае контрольной группы 1-А, реэпителизация не начиналась даже на день 14 и не завершалась на день 20. Результаты представлены в табл.2 и на фиг.18.

Результаты образования коллагеновых волокон представлены в табл.3. Как показано в табл.3, в тест-группах 1-А и 1-Д не наблюдалось значительного образования коллагеновых волокон вплоть до 7-го дня, что соответствовало оценке +1, тогда как тест-группы 1-В и 1-С соответствовали оценке 2+. Однако все тест-группы имели оценку 2+ на день 10, что соответствовало относительно большому количеству коллагеновых волокон. На день 14 наблюдалось образование коллагеновых волокон с высокой плотностью, что точно соответствовало оценке +3, как показано на фиг.19. Само собой разумеется, что более плотные коллагеновые волокна соответствуют лучшему заживлению ран.

4-3: Заживляющее действие на раны рекомбинантных белков β h3-D-IV, β h3-D-IV 2X, 3X и 4X, содержащих, по крайней мере, один 4-й домен

Исходя из обнаружения того факта, что β h3 D-IV, содержащий только 4-й домен, является эффективным для заживления ран, получали β h3 D-IV 2X, 3X

и 4X, которые содержали два, три и четыре 4-х домена, соответственно, для анализа на заживляющую раны активность.

Рекомбинантные белки анализировали на активность, способствующую адгезии клеток HCE, способом, описанным в примере 1-2. Результаты представлены на фиг.20. Как было показано, все рекомбинантные белки β h3 D-IV 2X, 3X и 4X эффективно индуцировали адгезию клеток HCE.

Для оценки заживляющего действия на раны рекомбинантных белков проводили нижеследующие эксперименты.

Взрослые крысы линии Sprague-Dawley весом 250-300 г получали стандартный корм и содержались в условиях постоянной температуры и влажности.

На спинке каждой крысы в тест-группе 2 делали четыре круглые раны в неповрежденном дермальном слое и покрывали хитозановой основой, объединенной с нужными материалами:

2-А: рану покрывали только хитозановой основой.

2-В: рану покрывали хитозановой основой в комбинации с 500 мкг/мл фибронектина.

2-Е: рану покрывали хитозановой основой в комбинации с 500 мкг/мл белка β ig-h3 D-IV 3X.

2-Ф: рану покрывали хитозановой основой в комбинации с 500 мкг/мл белка β ig-h3 D-IV 4X.

Композиты на основе хитозана получали следующим образом.

1 г водорастворимого хитозана (поли(1-4)-2-амино-2-дезоксид- β -D-гликана) с молекулярной массой 600000 Да растворяли в 100 мл стерильной дистиллированной воды и полученный 1% раствор распределяли по аликвотам 2 мл в 12-луночный планшет (Corning, USA), а затем добавляли 100 мкг гентамицина на лунку. После этого отдельно добавляли фибронектин, β h3-D-IV 3X и β h3-D-IV 4X до концентрации 500 мкг/мл и замораживали при -70°C , а затем лиофилизировали в сублимационной сушилке (Ishin) в течение 12 часов с получением композитов в форме дисков.

Спинки обработанных эфиром крыс выбривали, а затем выбритый участок стерилизовали раствором бетадина. На спинке каждой крысы формировали четыре круглые раны диаметром 7 мм, которые проникали во внутрь цельных дермальных слоев. Раны покрывали композитами, используемыми для тест-групп 2-А, 2-В, 2-Е и 2-Ф соответственно, а затем накладывали повязку Tegaderm® (3M) и слегка стягивали. Композиты меняли каждые три дня.

Заживляющее действие на раны определяли путем оценки внешнего вида ран, как описано в примере 4-2.

Высокоэффективное заживляющее действие на раны наблюдалось с использованием композита, содержащего рекомбинантный белок β h3-D-IV 3X или 4X.

Все крысы, за исключением всех членов тест-группы 2-А, одного члена тест-группы 2-В и двух членов тест-группы 2-Е и 2-Ф, полностью восстанавливались после ран на дни 12-15. Площади всех ран уменьшались в размере сразу после образования раны. Что касается тест-группы 2-А, то у крыс этой группы наблюдалось относительно

медленное уменьшение площади ран на протяжении всего периода заживления раны. В других тест-группах размеры ран значительно уменьшались в первые три дня, затем постепенно уменьшались до 9-го дня, а затем снова быстро уменьшались. При сравнении ран для всего 15-дневного периода наблюдались более значимые отличия ($p < 0,05$) в тест-группах 2-B, 2-E и 2-F, чем в тест-группе 2-A, как показано в табл.4 и на фиг.21.

Следовательно, рекомбинантные белки настоящего изобретения, которые содержат 2-й и 4-й домены β ig-h3, взятые отдельно или в комбинации друг с другом или в нескольких копиях, являются эффективными для клеточной адгезии и заживления ран, и в конечном счете могут быть использованы в целях получения агентов для культивирования клеток и заживления ран.

Промышленное применение

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным белкам, содержащим, по крайней мере, 2-й и 4-й домены β ig-h3, где одна аспарагиновая кислота и один изолейцин, которые, как известно, необходимы для связывания с интегрином, являются в высокой степени консервативными. Кроме того, рекомбинантные белки сами могут быть использованы для клеточной адгезии и заживления ран, что может способствовать разработке методов культивирования клеток и получению агентов для заживления ран.

Настоящее изобретение описано на иллюстративных примерах, но при этом, следует отметить, что используемая терминология имеет лишь описательный, а не ограничивающий характер. Исходя из вышеприведенного описания, в настоящее изобретение может быть внесено множество модификаций и изменений. Поэтому, очевидно, что настоящее изобретение может быть реализовано способами, описанными в настоящей заявке, или иными способами, не выходящими за рамки объема формулы изобретения.

Таблица 1
Закрывающее действие на раны мазевых основ, содержащих рекомбинантные белки β ig-h3

Группа	День											
	0	2*	4	6	8*	10*	12	14	16	18	20	22
I-A (Контроль)	3,15 ±0,49	3,09* ±0,31	2,45 ±0,39	2,17 ±0,46	1,64* ±0,50	1,80* ±0,11	0,84 ±0,32	0,56 ±0,31	0,34 ±0,07	0,19 ±0,04	0,17 ±0,05	0,08 ±0,01
I-B (Фибронек- тин)	3,17 ±0,78	2,38* ±0,55	2,01 ±0,54	1,83 ±0,42	1,39* ±0,38	1,26* ±0,18	0,54 ±0,11	0,39 ±0,12	0,25 ±0,12	0,16 ±0,09	0,12 ±0,09	0,06 ±0,03
I-C (His-β-b)	3,14 ±0,46	2,58* ±0,47	1,89 ±0,26	1,71 ±0,33	1,42* ±0,45	1,37* ±0,71	0,46 ±0,06	0,36 ±0,13	0,26 ±0,09	0,15 ±0,10	0,11 ±0,03	0,03 ±0,01
I-D (βig-η3-D- IV)	3,15 ±0,43	2,62* ±0,52	2,37 ±0,45	1,98 ±0,52	1,51* ±0,21	0,98* ±0,69	0,44 ±0,24	0,22 ±0,09	0,20 ±0,09	0,18 ±0,10	0,13 ±0,07	0,06 ±0,01

Величина: среднее $\pm$ ср. кв. от.

*: $p < 0,05$ в соответствии с ANOVA и критерием Шеффе
a, b: вертикально значимые отличия данных в статистике

Таблица 2

Группа	День				
	3	7	10	14	20
1-A (Контроль)	0	0	0	0	2+
1-B (Фибронектин)	0	1+	1+	2+	3+
1-C (His- β -b)	0	0	1+	2+	3+
1-D (BigD-IV)	0	0	1+	2+	3+

Таблица 3

Группа	День				
	3	7	10	14	20
1-A (Контроль)	1+	1+	2+	3+	3+
1-B (Фибронектин)	1+	2+	2+	3+	3+
1-C (His- β -b)	1+	2+	2+	3+	3+
1-D (BigD-IV)	1+	1+	2+	3+	3+

Оценки образования коллагеновых волокон:

0 : отсутствует, 1+ : незначительное

2+ : разрозненные волокна, 3+ : очень плотные волокна

Таблица 4

Группа	Уменьшение площади раны (см ²)					
	0	3*	6*	9*	12*	15*
2-A (Контроль)	49,344, 8	35,320, 8*	28,180, 8*	19,880, 8*	10,880, 8*	3,420, 8*
2-B (Фибронектин)	49,280, 5	24,140, 8*	19,880, 8*	8,780, 8*	3,220, 8*	8,840, 8*
2-C (Фибронектин)	49,280, 5	24,140, 8*	19,880, 8*	17,280, 8*	5,620, 8*	1,220, 8*
2-D (Фибронектин)	49,280, 5	24,140, 8*	19,880, 8*	17,280, 8*	5,620, 8*	1,220, 8*
2-E (Фибронектин)	49,280, 5	24,140, 8*	19,880, 8*	17,280, 8*	5,620, 8*	1,220, 8*

Величина: среднее $\pm$ ср. кв. от.

*: $p < 0,05$ в соответствии с ANOVA

а, b: вертикально значимые отличия данных в статистике

Формула изобретения:

1. Способ прикрепления клетки млекопитающего к рекомбинантному белку, включающему одну или более копий 2-го и/или 4-го домена fas-1 β ig-h3, при этом 2-й домен fas-1 включает аминокислотную последовательность 237-377 β ig-h3 и 4-й домен fas-1 включает аминокислотную последовательность 498-637 β ig-h3, включающий следующие стадии: 1) получение рекомбинантного белка,

включающего одну или более копий 2-го и/или 4-го домена fas-1 pig-h3; 2) покрытие рекомбинантным белком твердого носителя и 3) нанесение клеток на покрытый белком твердый носитель.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что рекомбинантный белок включает аминокислотную последовательность 498-637 pig-h3 в четырех копиях.

3. Экспрессирующий вектор p_{ig}-h3 D-11, кодирующий аминокислотную последовательность 237-377 pig-h3 и способный экспрессировать 2-й домен fas-1 pig-h3.

4. Штамм E.coli, трансформированный экспрессирующим вектором по п.3, обозначенный как E.coli BL21/His_β-g (регистрационный номер KCTC 0905BP).

5. Экспрессирующий вектор p_{ig}-h3 D-IV, кодирующий аминокислотную последовательность 498-637 pig-h3 и способный экспрессировать 4-й домен fas-1 pig-h3.

6. Штамм E.coli, трансформированный экспрессирующим вектором по п.5,

обозначенный как E.coli BL21/His_β-e (регистрационный номер KCTC 0904BP).

7. Экспрессирующий вектор p_{ig}-h3 D-IV 4X, экспрессирующий рекомбинантный белок, включающий аминокислотную последовательность 498-637 pig-h3 в четырех копиях.

8. Штамм E.coli, трансформированный экспрессирующим вектором по п.7, обозначенный как E.coli BL21/His_β-e 4x (регистрационный номер KCTC 0906BP).

9. Способ заживления ран у млекопитающего с помощью рекомбинантного белка, включающего одну или более копий 2-го и/или 4-го домена fas-1 pig-h3, при этом 2-й домен fas-1 включает аминокислотную последовательность 237-377 pig-h3 и 4-й домен fas-1 включает аминокислотную последовательность 498-637 pig-h3, включающий следующие стадии: 1) получение рекомбинантного белка, включающего одну или более копий 2-го и/или 4-го домена fas-1 pig-h3; 2) смешивание рекомбинантного белка с основанием и 3) нанесение смеси на раны.

25

30

35

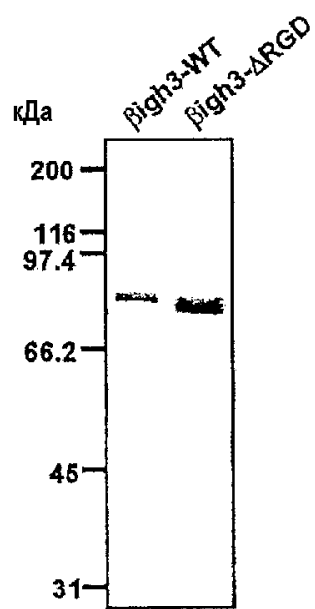
40

45

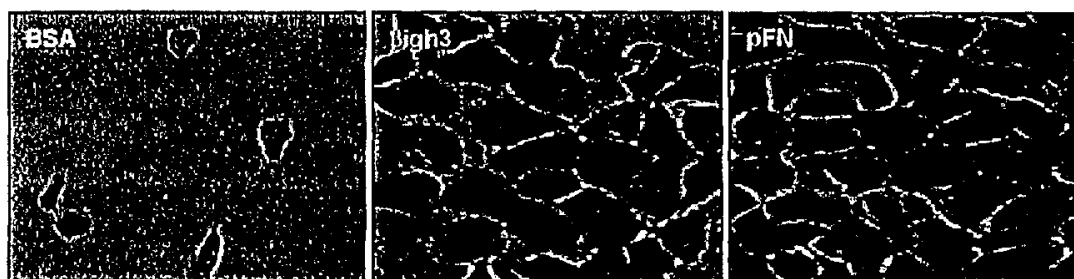
50

55

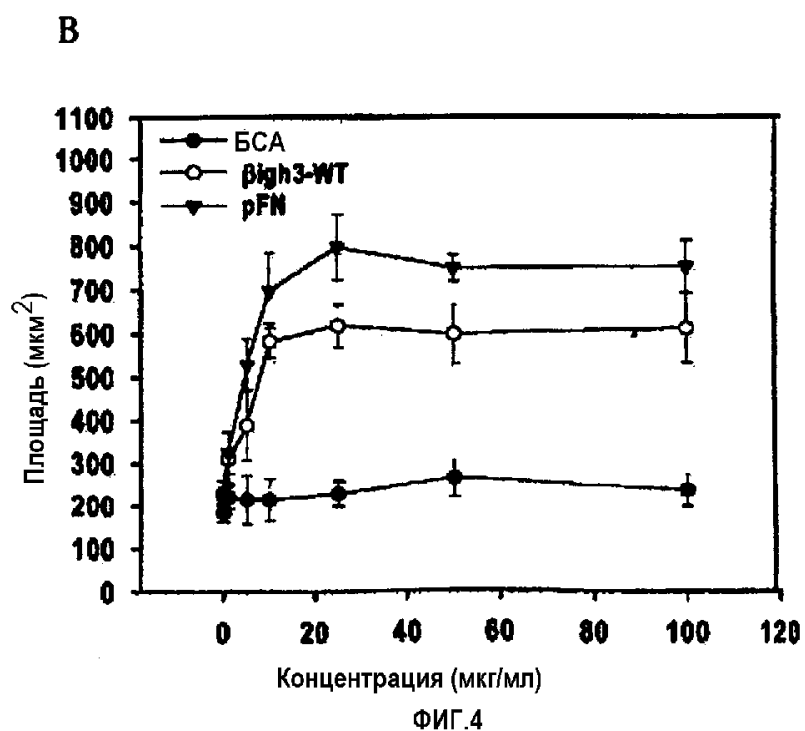
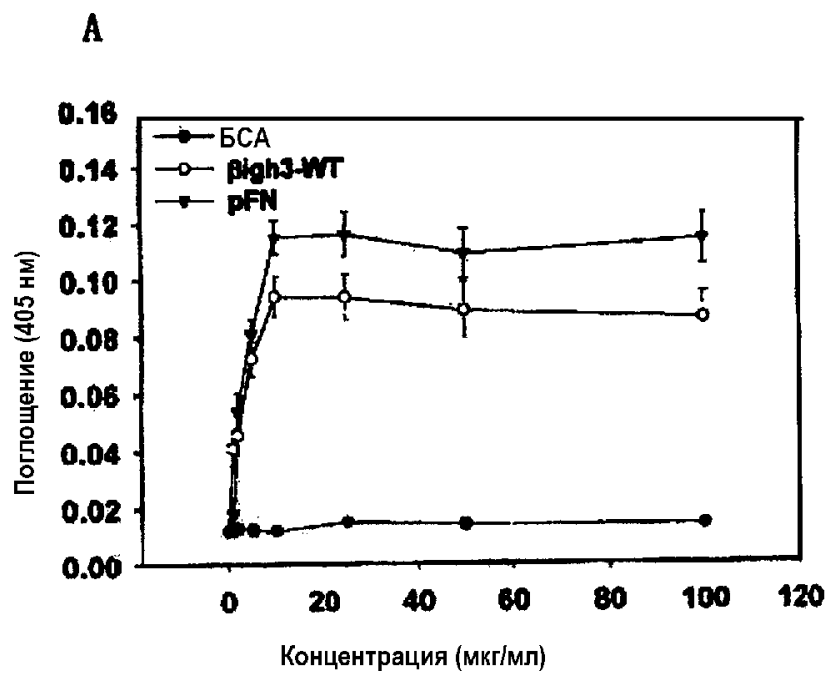
60



ФИГ.2

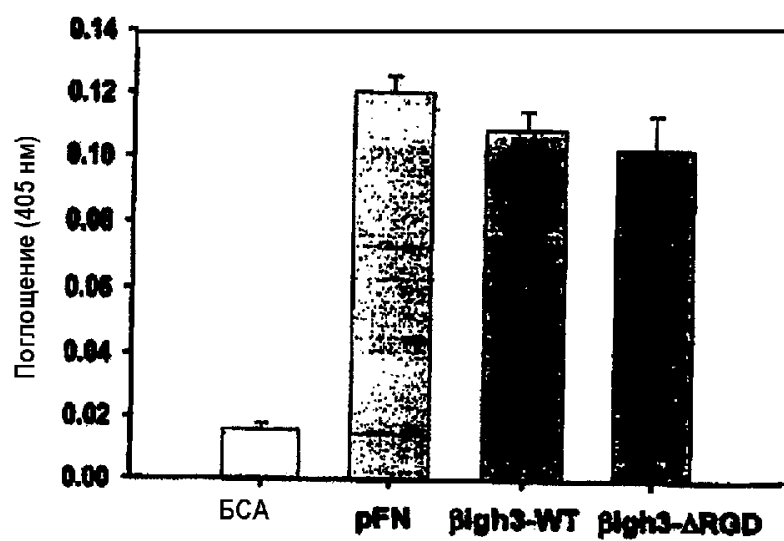


ФИГ.3

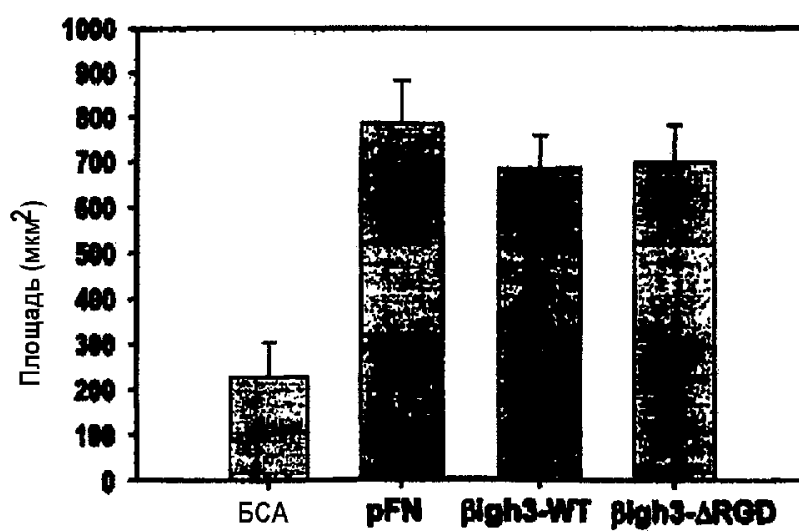


ФИГ.4

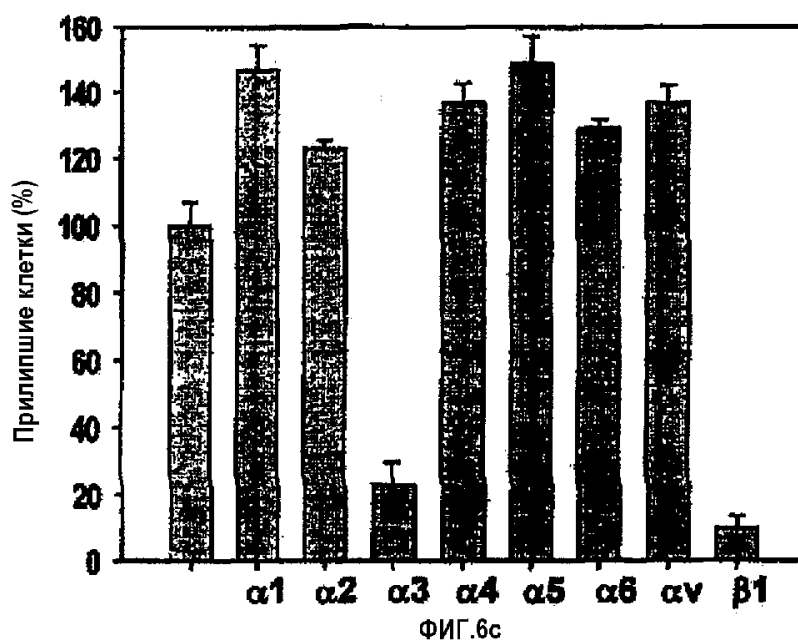
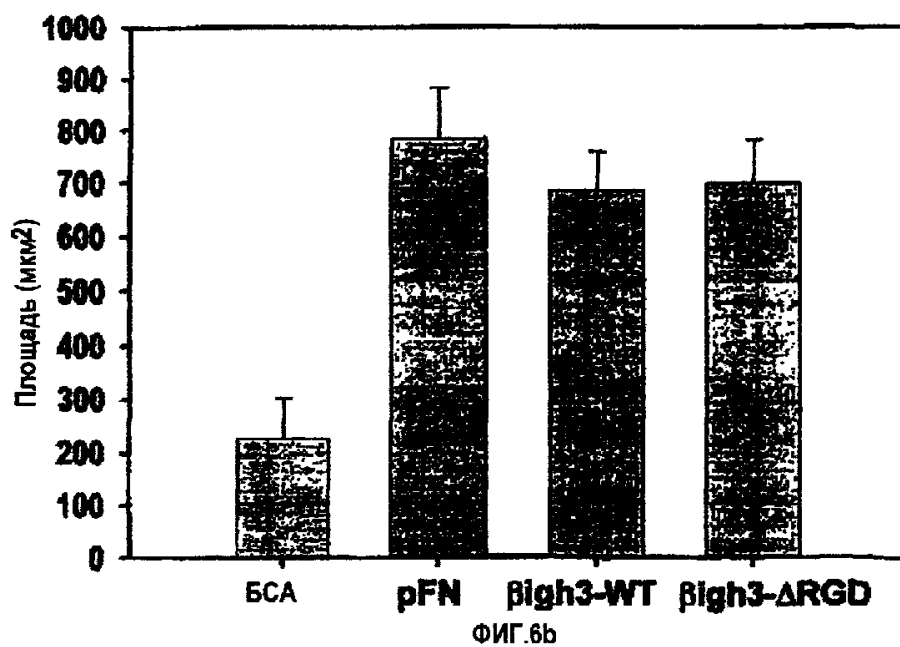
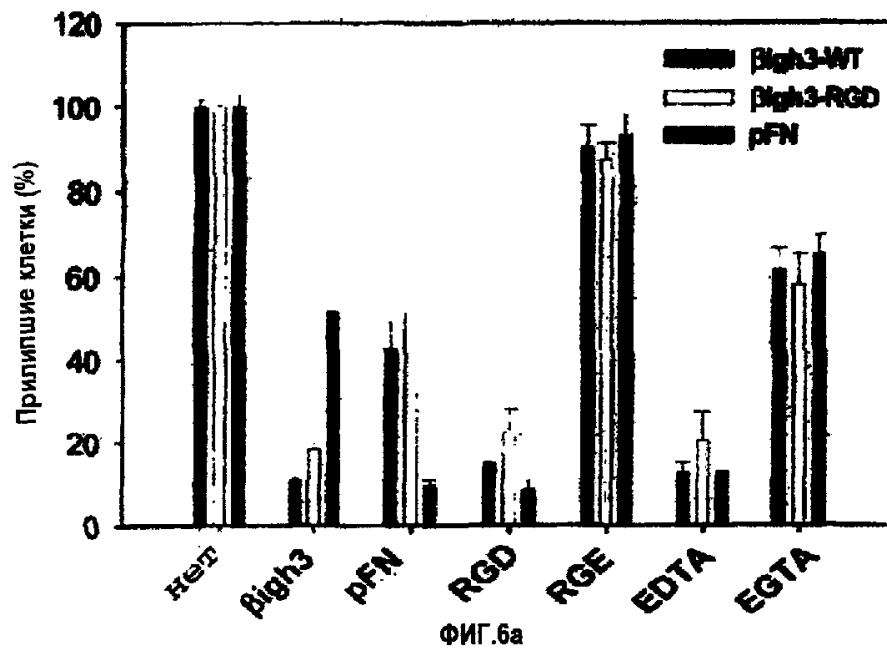
A

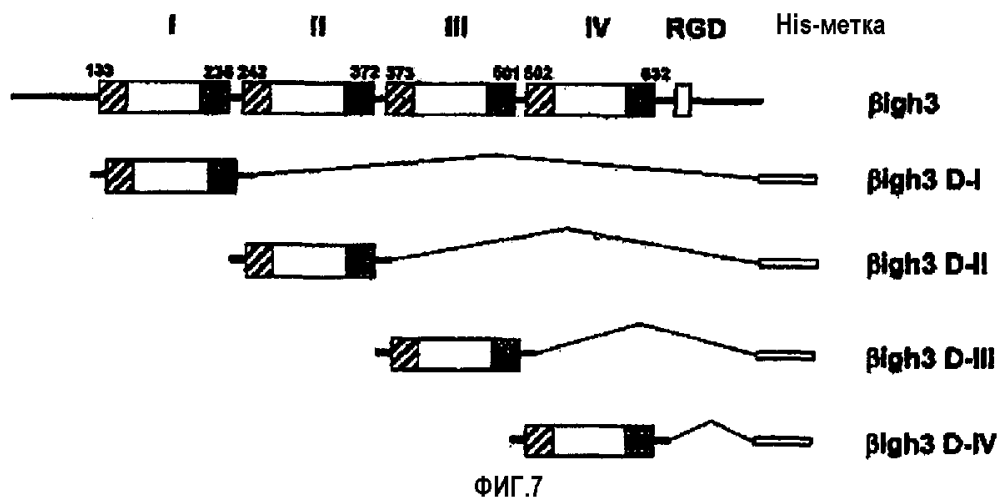
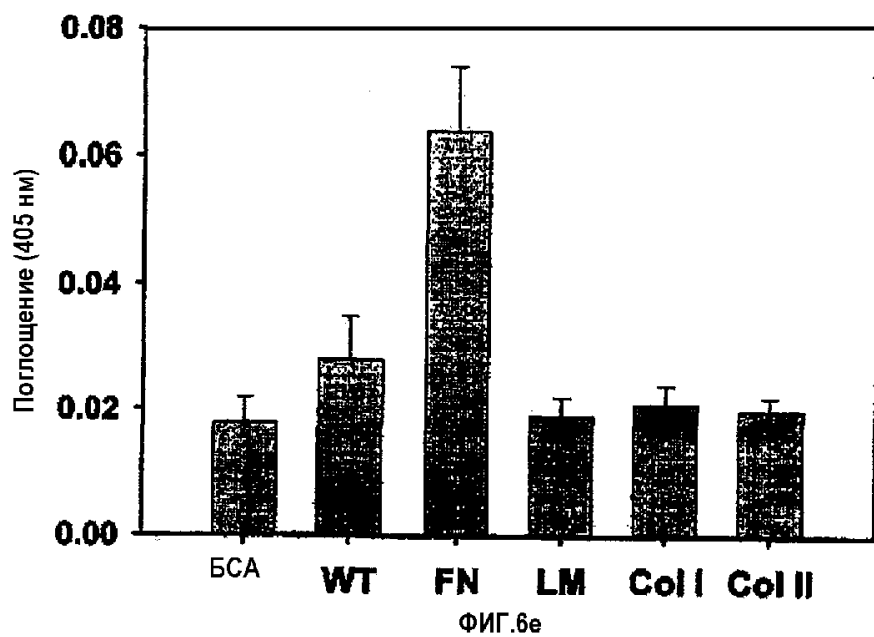
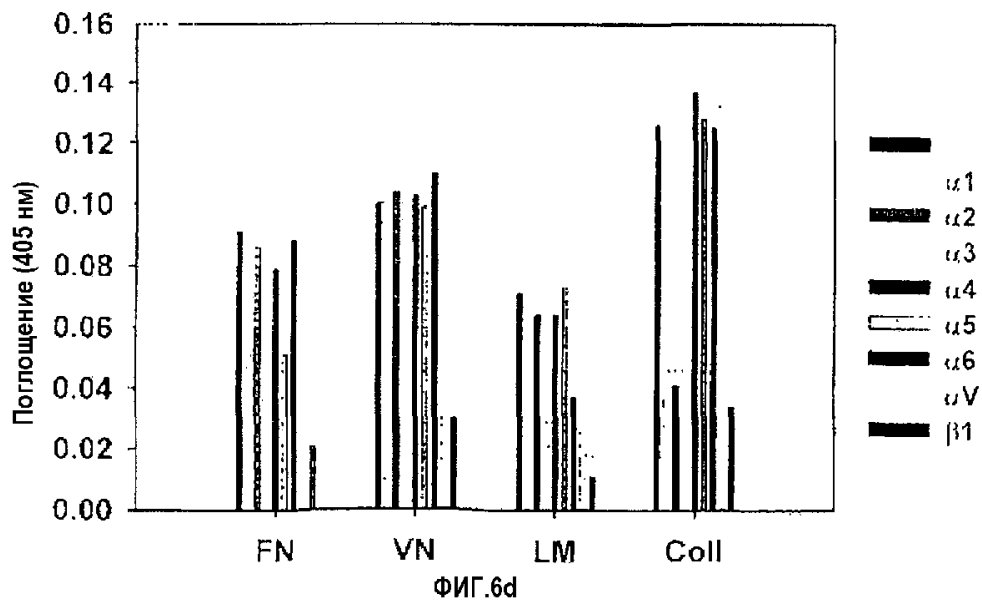


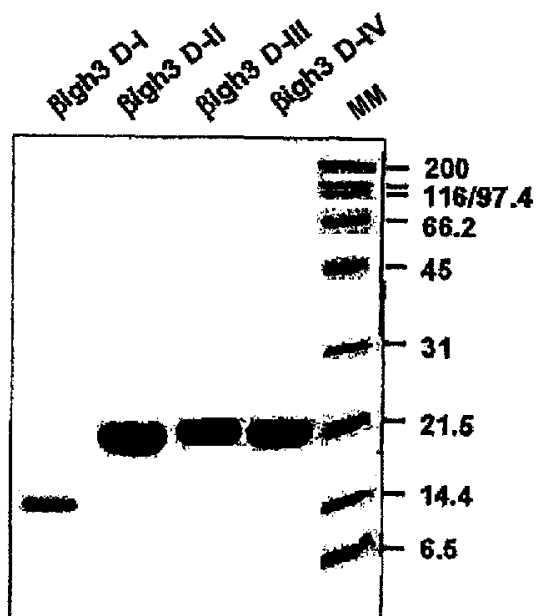
B



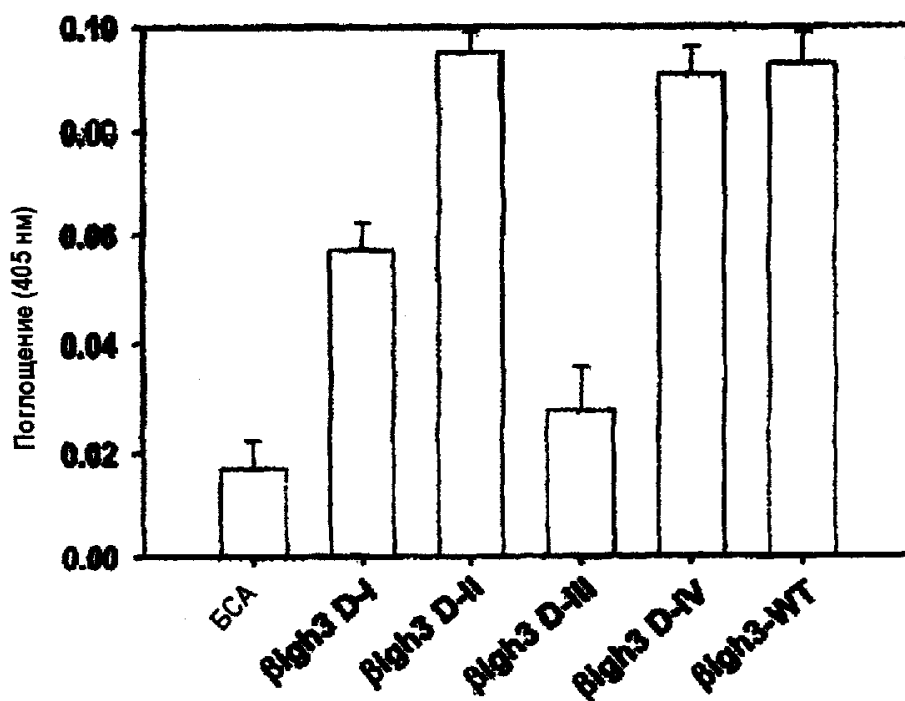
ФИГ.5



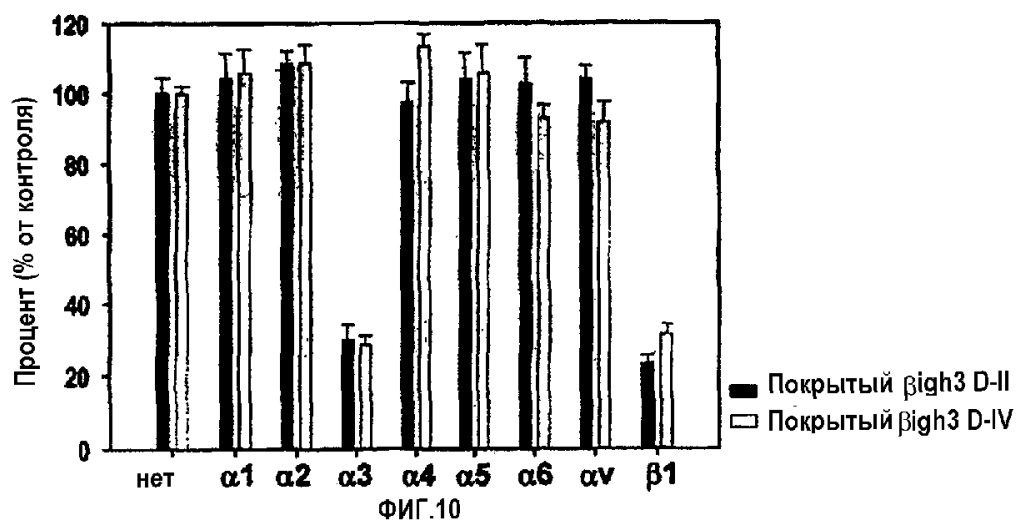




ФИГ.8



ФИГ.9



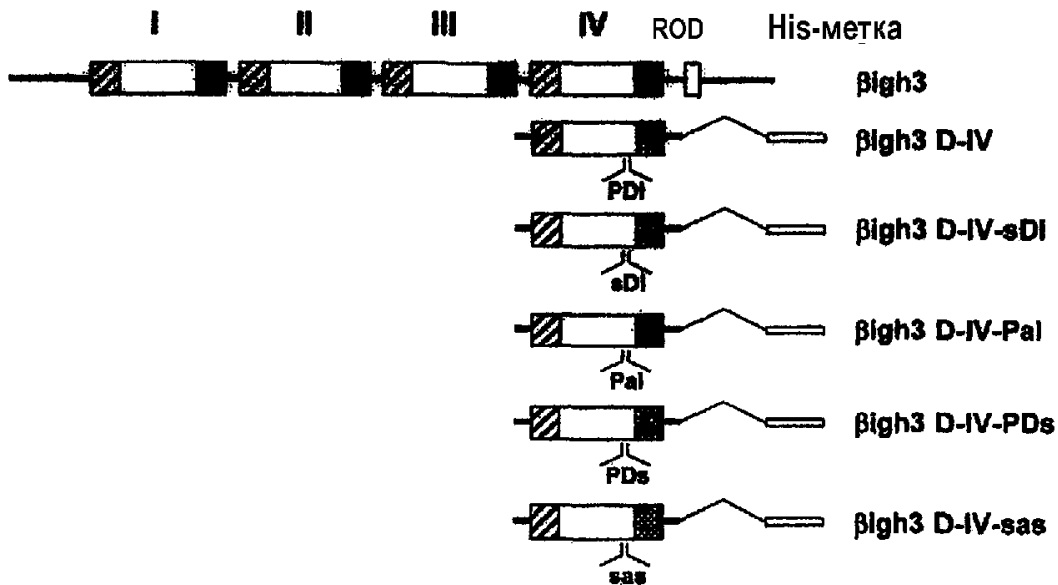
ФИГ.10

BIGH3_ ЧЕЛОВЕКА	211	TVNCARLLKADHHATNGVVHLIDKVI...	236
BIGH3_ СВИНЬИ	211	TVNCARLLKADHHATNGVVHLIDKVI...	236
BIGH3_ КУРИЦЫ	201	TVNCARLLKADHHATNGVVHVIDKVI...	228
BIGH3_ ЧЕЛОВЕКА	346	INGKAIISNKDILATNGVIHYIDELLI..	372
BIGH3_ СВИНЬИ	346	INGKPIISNKDVLATNGVIHFIDELLI..	372
BIGH3_ КУРИЦЫ	338	INGRAIIANKDILATNGVVHFVNELLI..	364
OSF2_ ЧЕЛОВЕКА	340	VNGIKMVNKKDIVTNGVIHLIDQVLI..	366
OSF2_ МЫШИ	342	INGIKMVNKKDIVTKNGVIHLIDEVLI..	368
BIGH3_ ЧЕЛОВЕКА	608	VNKEPVAE-PDLMATNGVVHVITNVL...	632
BIGH3_ СВИНЬИ	608	VNKEPVAE-ADLMATNGVVHTINTVL...	632
BIGH3_ КУРИЦЫ	600	VNKEPVAE-SDLMATNGVIHAVSSVL...	624
SLL1735 ГОМОЛОГ	106	VKNATVLA-ADTEADNGIIHVIDNVILMG	133
SLL1735	106	VKNATVIL-PDEADNGIIHVIDNVILMG	133
SLL1483	152	VNKATVIS-ADVDASNGVIHVIDQVIL..	177
OSF2_ ЧЕЛОВЕКА	604	VNELKSKE-SDIMTTNGVIHVVDKLL...	628
OSF2_ МЫШИ	606	VNELKSKE-SDIMTTNGVIHVVDKLL...	630
СРЕДИННЫЙ ПУЧОК	543	INNLAIIIDADIMGTNGVLHVIDTIL...	568
HLC-32	341	-SKASRVILRDIPTTNGVIQVIDRVIL..	366
СРЕДИННЫЙ ПУЧОК	825	KIENAGVTKCEVVATNGILHEINDIIV..	851
HLC-32	196	TANGARVVEADRKASSGLIHVVDKVI...	221

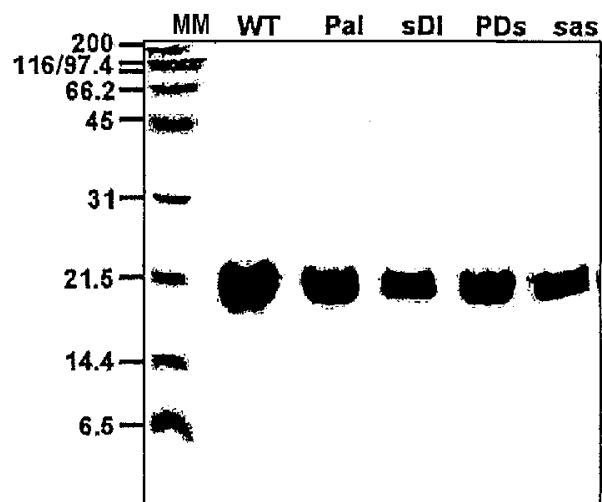
КОНСЕНСУС

VNNAARVVKA~~D~~HHATNGVIHVIDKVLIMG

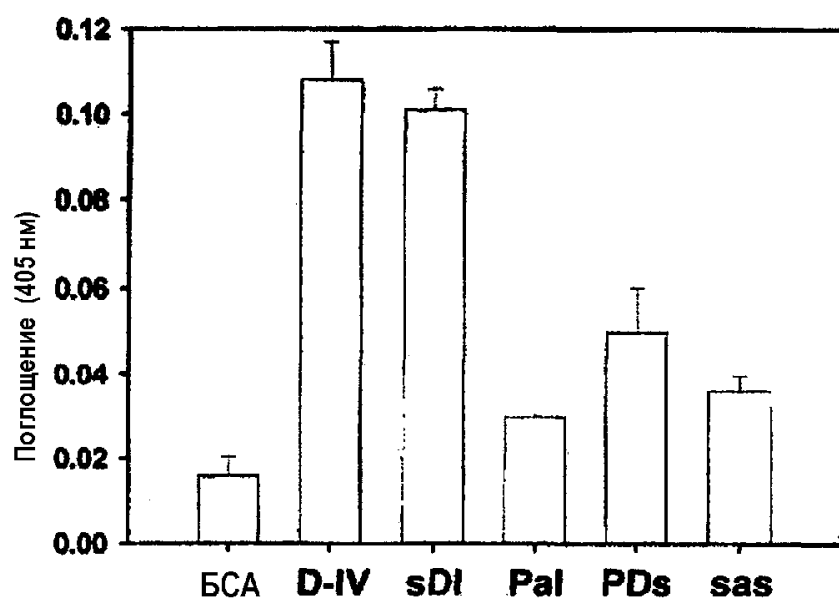
ФИГ.11



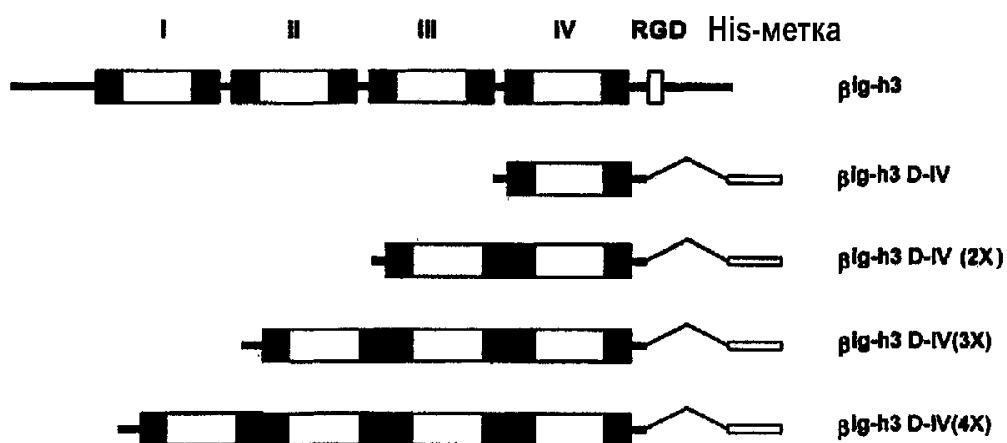
ФИГ.12



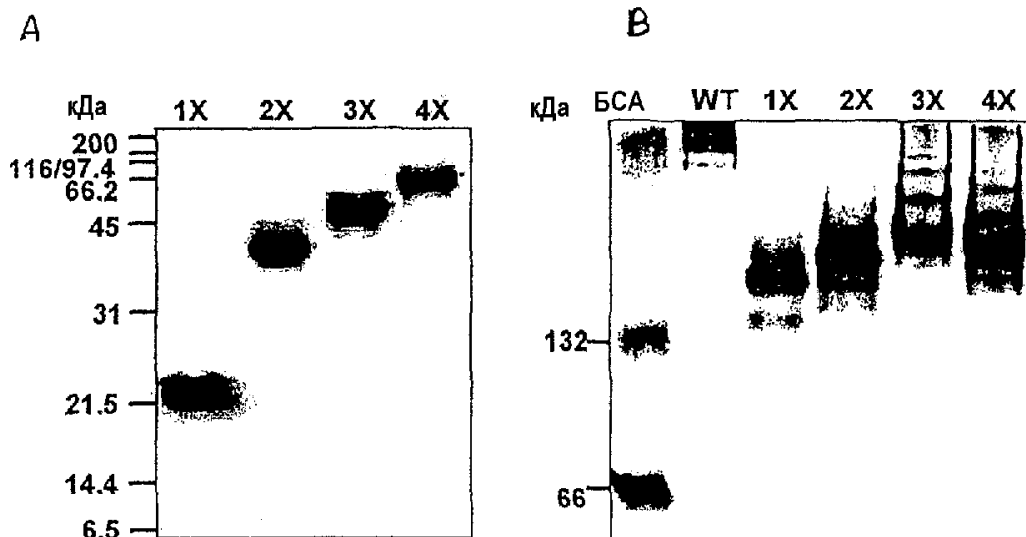
ФИГ.13



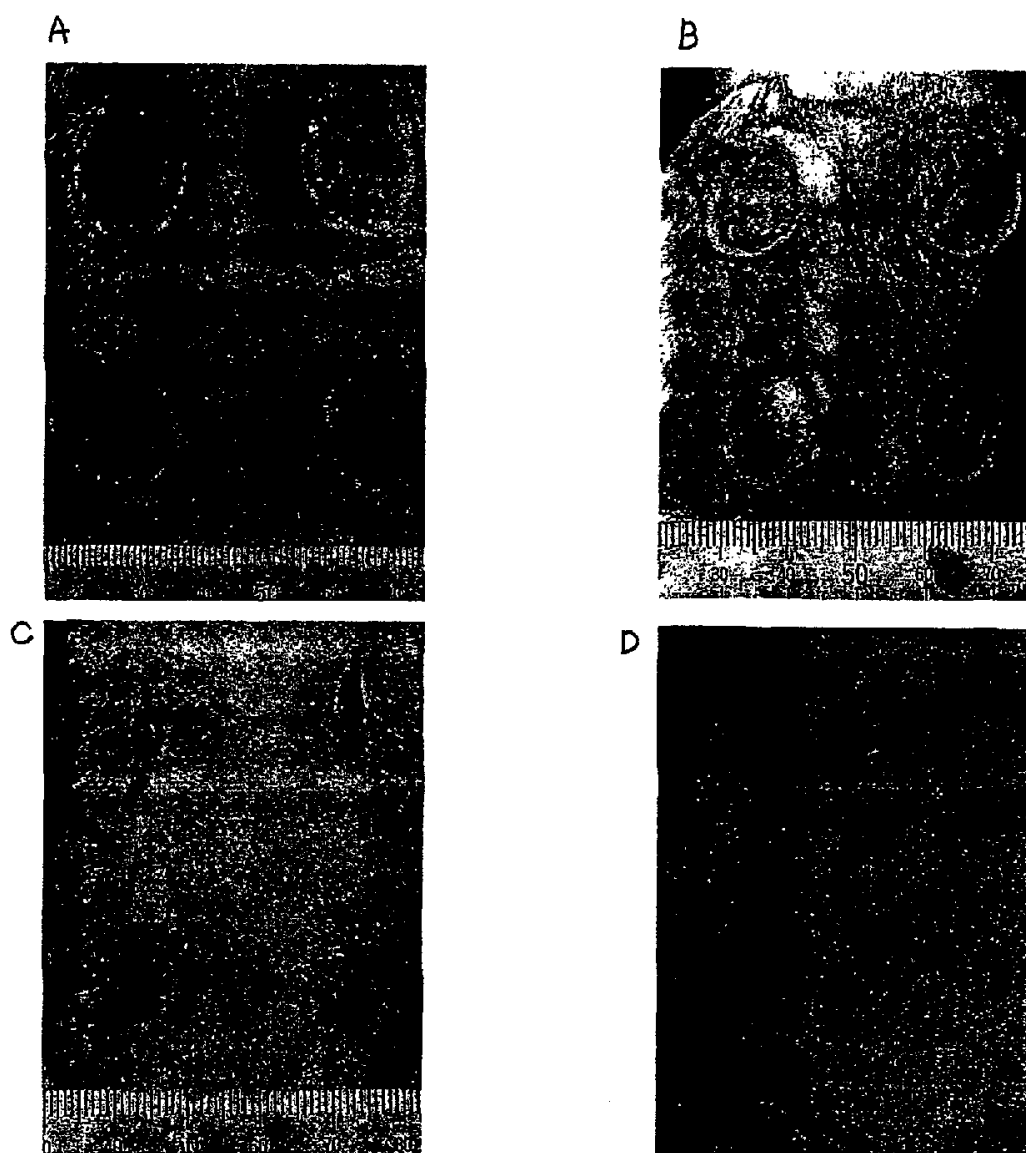
ФИГ.14



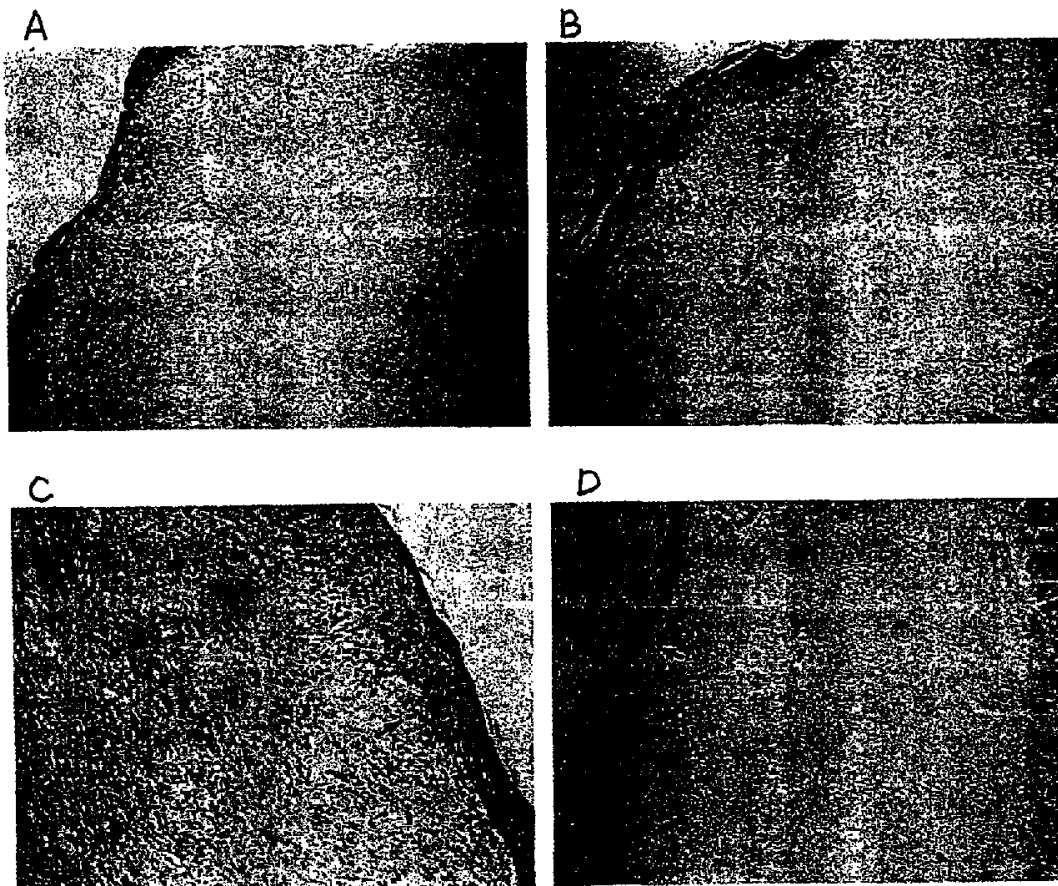
ФИГ.15



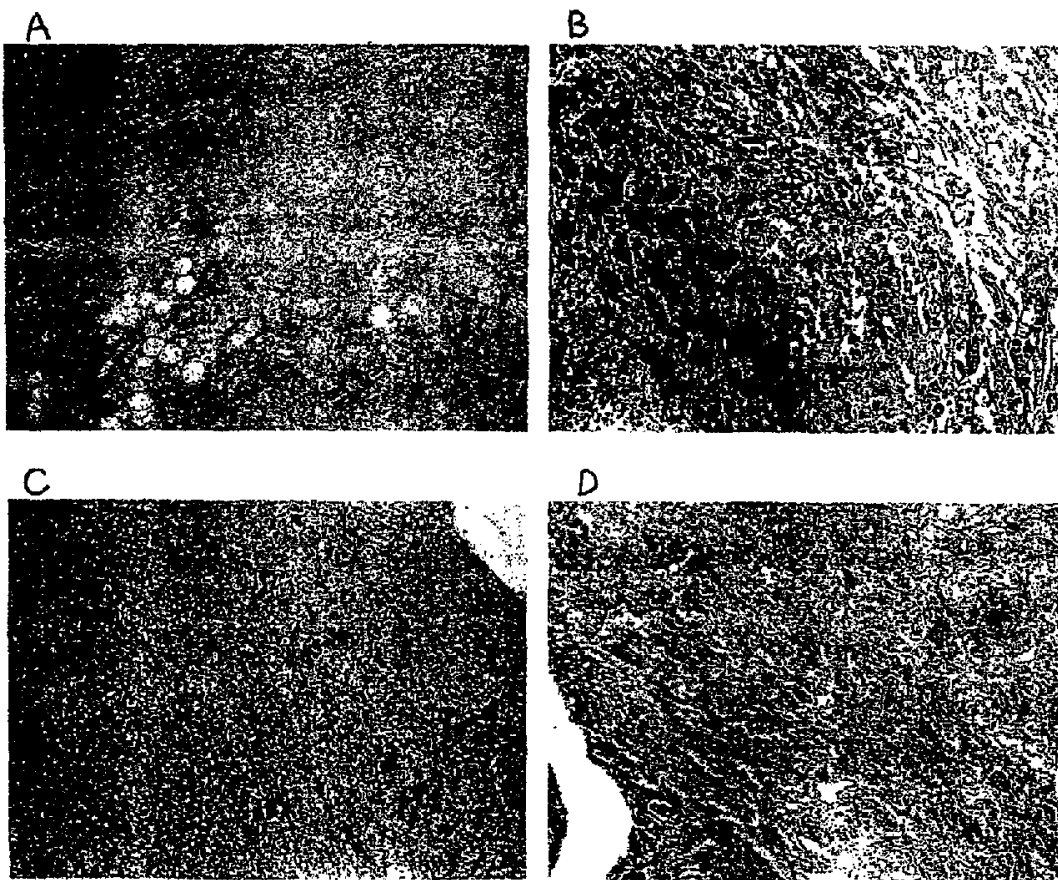
ФИГ.16



ФИГ. 17



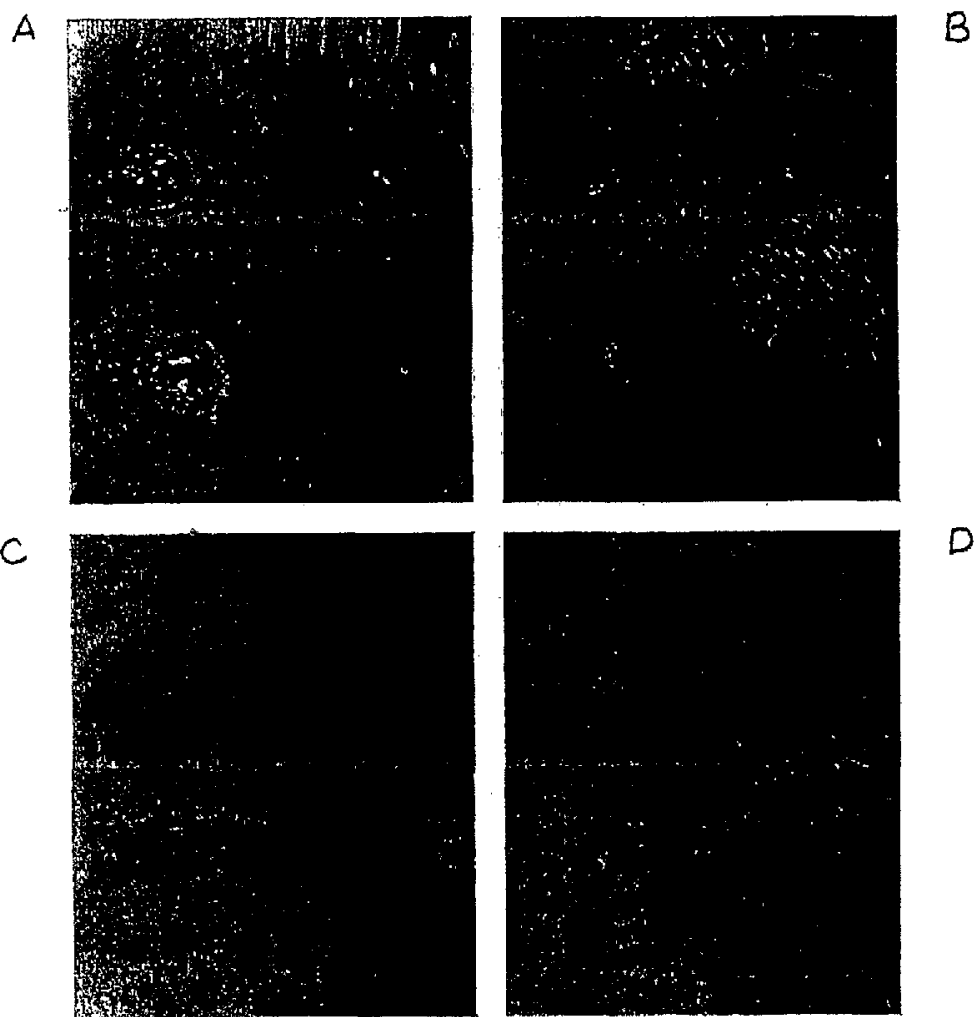
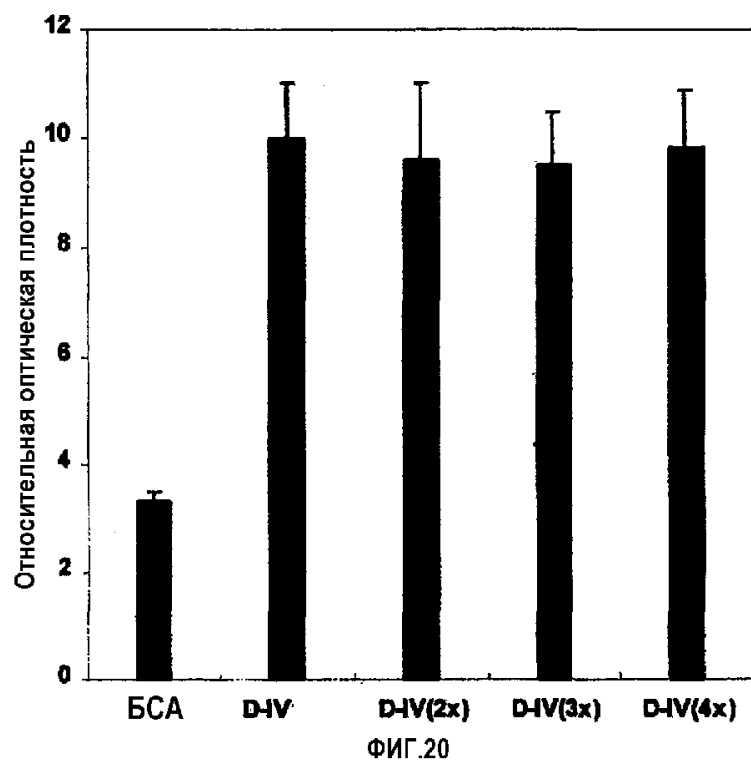
ФИГ.18



ФИГ.19

RU 2234937 C2

RU 2234937 C2



ФИГ.21