MIRZO ULUG‘BEK NOMIDAGI
O‘ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETI
JIZZAX FILIALI



"BIOTEXNOLOGIYANING RIVOJLANISH ISTIQBOLLARI VA MUAMMOLARI"

MAVZUSIDAGI RESPUBLIKA MIQYOSIDAGI ILMIY-TEXNIK ANJUMAN TO‘PLAMI





28-29-MART
2025-YIL

doi

Google Scholar

O‘ZBEKISTON RESPUBLIKASI OLIY TA’LIM, FAN VA INNOVATSIYALAR VAZIRLIGI

MIRZO ULUG‘BEK NOMIDAGI O‘ZBEKISTON MILLIY UNIVERSITETINING JIZZAX FILIALI

BIOTEXNOLOGIYANING RIVOJLANISH ISTIQBOLLARI VA MUAMMOLARI

RESPUBLIKA ILMIY ANJUMANINING TEZISLAR TO‘PLAMI

28-29 mart 2025 y

***

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ И ИННОВАЦИЙ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

ДЖИЗАКСКИЙ ФИЛИАЛ НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА УЗБЕКИСТАНА ИМЕНИ МИРЗО УЛУГБЕКА

СБОРНИК ТЕЗИСОВ РЕСПУБЛИКАНСКОЙ НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

«ПЕРСПЕКТИВЫ И ПРОБЛЕМЫ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИЙ»

28-29 марта 2025 г.

JIZZAX – 2025

REKOMBINANT TRASTUZUMAB ANTITANASINI KODLOVCHI PLAZMID KONSTRUKSIYA YARATISH

Muzaffar Muminov., Ibrat Karimov., Vladimir Tsoy., Egor Pshenichnov., Nargiza Tsiferova., Soyibjon Bozorov., Shahlo Turdikulova
E-mail: muminov.imbio@gmail.com

Annotatsiya. Saraton kasalligi tez o‘sib, 2020-yilda 18 million yangi holat va 10 million o‘lim qayd etilgan. 2040-yilga kelib, bu ko‘rsatkichlar 29,9 million va 15,3 millionga yetishi prognoz qilinmoqda. Ko‘krak bezi saratoni eng keng tarqalgan bo‘lib, 2022-yilda O‘zbekistonda 5 022 ta holat qayd etilgan.

HER-2 (Inson epidermal o‘sish omili retseptori 2) geni amplifikatsiyasi ko‘krak bezi saratoni holatlarining 20-25% ida kuzatilib, o‘smaning tajovuzkor rivojlanishiga sabab bo‘ladi. Trastuzumab kabi dorilar samarali bo‘lsa-da, yuqori narx va talabning ortishi O‘zbekistonda uning mavjudligini cheklamoqda. Shu sababli, biz arzonroq mahalliy analog ishlab chiqishni maqsad qildik.

Buning uchun trastuzumab analoglari tahlil qilindi, va insonlashtirilgan trastuzumab oqsili genining nukleotid ketma-ketligi CHO hujayralarida ifodalanishiga mos ravishda kodon optimizatsiya qilindi. Virtual konstruksiya pVITRO1 plazmididan foydalangan holda ishlab chiqildi va yengil va og‘ir zanjir kodlash ketma-ketliklari uchun zaruriy elementlar kiritildi. Trastuzumabning og‘ir zanjir geni IgE signal peptidi bilan ishlab chiqilib, mEF1 promotor ostida, mEF-1a intronini o‘z ichiga olgan holda joylashtirildi, yengil zanjir esa rEF1 promotor ostida o‘sha IgE signal peptidi bilan kodlandi. Ushbu konstruksiya E. coli ga kiritildi, ijobiy klonlar PZR orqali genning kiritilgani tasdiqlandi.

Kalit so'zlar: HER-2, Ko'krak saratoni, Trastuzumab, Antitana.

Ko'krak bezi saratoni butun dunyo bo'ylab ayollar orasida eng keng tarqalgan saraton va saraton bilan bog'liq o'limning asosiy sababidir. 2022 yilda dunyo bo'ylab taxminan 2,3 million yangi holat aniqlanib, 670 000 kishining o'limiga sabab bo'ldi. Davolash usullari takomillashgani tufayli yuqori daromadli mamlakatlarda o‘lim darajasi pasaymoqda, biroq past va o‘rta daromadli hududlarda yuqoriligicha qolmoqda [1].

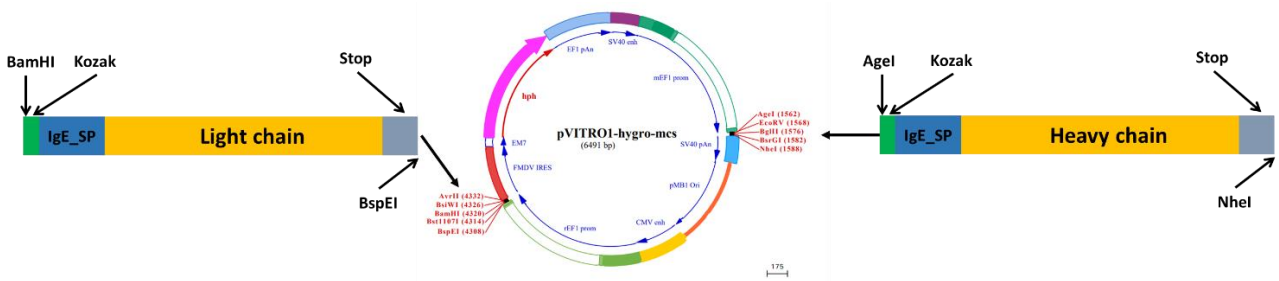
Ko'krak saratoni kelib chiqishi va molekulyar xususiyatlariga ko'ra bir qator toifalarga bo’linib, HER2-musbat ko'krak saratoni keng tarqalgan turlaridan biri bo’lib, HER2 oqsilining haddan tashqari ko'payishi bilan tavsiflanadi. Ko'pincha tajovuzkor, ammo maqsadli terapiyaga sezgir [2].

HER-2 ning ortiqcha ekspressiyasi yoki amplifikatsiyasi ko‘krak bezi saratonining og‘ir kechishi va yomon prognoziga sabab bo‘ladi. HER-2+ holatida monoklonal antitanachalarga asoslangan maqsadli terapiya muhim ahamiyatga ega.

ERBB2 geni (17q21) HER2 ni kodlab, uning ortiqcha ifodalanishi nazoratsiz hujayra ko‘payishi va metastazga olib keladi [3-4].

Ko'krak bezi saratonida biomarker sifatida HER2 ning kashf etilishi va klinik tavsifi preklinik modellarda istiqbolli antitumor faolligini ko'rsatadigan monoklonal antikorlarning (mAbs) rivojlanishiga turtki bo'ldi. Ular orasida, inson HER2 ga qaratilgan sichqon mAb ajoyib klinikadan oldingi faollikni namoyish etdi va keyinchalik humAb4D5-8 ga insoniylashtirildi (maxsus mutatsiyalarni kiritish orqali odam antitanasiga struktura jihatdan moslashtirish), va trastuzumab nomini oldi [5] va ushbu turdagi rak holatlarini davolashda keng qo’llanilmoqda.

Materila va metodlar. Trastuzumab antitanasining og’ir (HC) va yengil (LC) zanjirlari ketma-ketliklari xalqaro genome.jp (KEGG Drug database) omboridan olinib, Expasy protparam [6] dasturida tahlil qilindi. Oqsilni CHO hujayralarida muvaffaqiyatli ekspressiyasi uchun 5’ uchiga IgE signal peptidi hamda kozak ketma-ketligi qo’shildi. Translyatsiyaning muvaffaqiyatli to’xtashi uchun 3’ uchlariga 3 ta stop kodon qo’shildi (1-rasm).



1-rasm. pVITRO1 plazmidasiga trastuzumab og’ir va yengil zanjirlarini klonlash.

Yaratilgan konstruksiyalar CHO hujayralarida yaxshi ekspresiyalanishi uchun ikki ketma-ketlik ham NovoProlabs EXPoptimizer codon optimizatsiya dasturida CHO hujayralari kondonlariga moslashtirib, ekspressiyani oshirish maqsadida GC tarkibi va noyob kodonlar chastotasi muvofiqlashtirildi [7].

Restriksiya saytlari kiritish: Genlarning plazmida uchun klonlanishini osonlashtirish maqsadida og’ir zanjirning boshlanish va yakuniy qismida mos ravishda AgeI va NheI restriksiya saytlari, yengil zanjirga esa BamHI va BspEI syatlari qo'shildi.

Sintetik gen yaratish: Dizaynlangan HC va LC ketma-ketliklari tijorat gen sintez kompaniyasi GenScript (AQSh) ga yuborilib, buyurtma asosida sintez qilinib, sekvins ketma-ketligi tasdiqlandi hamda restsiya-ligaza usulida plazmidaga klonlandi.

Nihoyat yaratilgan vektor konstruksiya *Escherichia coli* hujayralariga standart kimyoviy tranformatsiyalash usuli orqali kiritilib, plazmida Qiagen plasmid purification kit (Germaniya) yordamida ishlab chiqaruvchi protokoliga asosan tozalab olindi. Ajratib olingan plazidalar tarkibida trastuzumab antitanasini

kodlovchi genlarni aniqlash uchun gen spetsifik PZR reaksiyasi Q5 DNA polymerase (NEB, AQSh) yordamida ishlab chiqaruvchi protokoli asosida o'tkazildi. Vektor konstruksiya va PZR mahsulotlari mos ravishda 1 va 2 %li agaroza geli yordamida vizualizatsiyalandi.

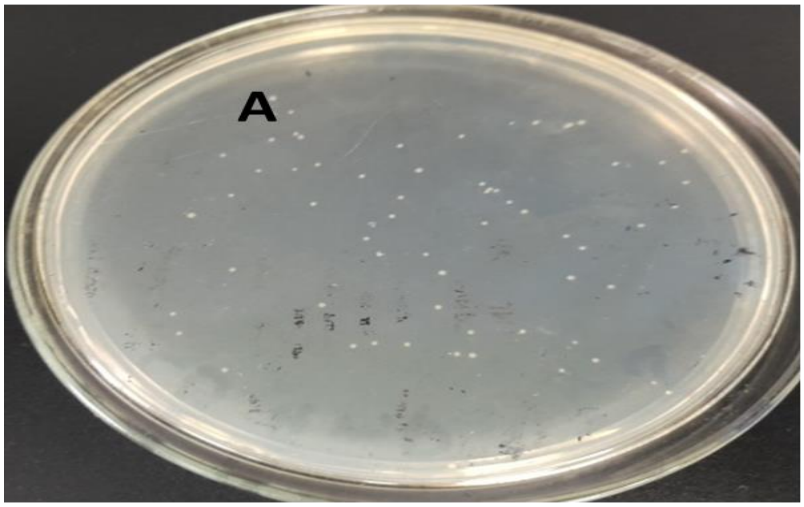
Natijalar: Og'ir va yengil zanjirlarning bioinformatik tahlili kutilganida zanjirlarning molekulyar massasi mos ravishda 50 va 25 kDa ga yaqin ekanligini hamda oqsilning musbat zaryadga ega ekanligini ko'rsatdi (1-jadval).

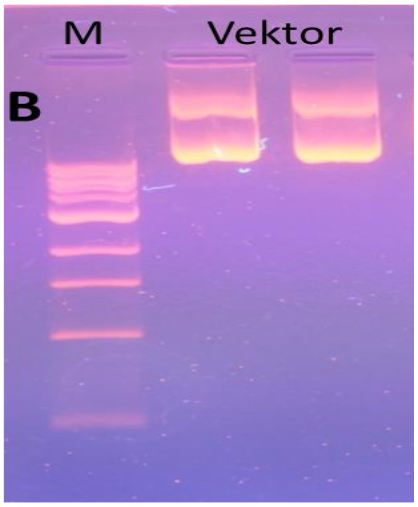
1 – jadval.

Trastuzumab oqsili zanjirlarining bioinformatik tahlili

Parametrlar	**Og'ir zanjir**	**Yengil zanjir**
Amino kislotalar soni	449	214
Hisoblanga molekulyar og'irligi	49.15 kDa	23.4 kDa
Teoretik izoelektrik nuqtasi	8.36	7.76
Negativ aminokislotalar soni Asp + Glu	40	19
Musbat aminokisloatar soni Arg + Lys	44	20
Alifatik indeksi	70.02	64.67
GRAVY indeksi	-0.392	-0.452

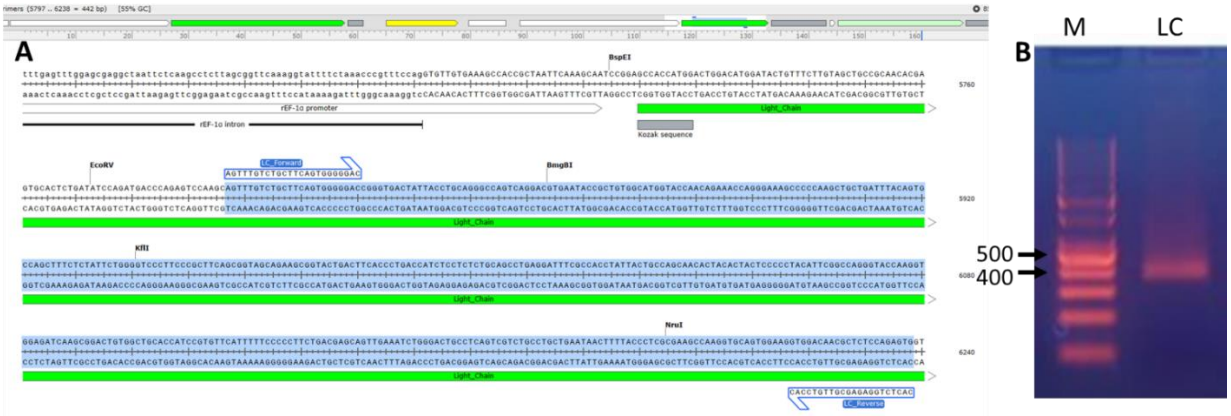
CHO hujayralarida oqsil ekspressiyasidan oldin plazmidalar *E. coli* da ko'paytirildi. Natijada, 25 ng plazmid DNK bakteriyaga heat-shock orqali kiritilganda, gigromitsinga chidamli 60 dan ortiq koloniyalar olindi (2A-rasm). Keyinchalik, 50 μg/ml gigromitsin tutgan 100 mL ozuqa muhitida o'stirilgan pozitiv koloniyada plazmida DNKsi tozalab olinganib, agaroza gelida tekshirilganda plazmidaga xos bendlar hosil bo'ldi (2B-rasm).





2-rasm. Konstruksyaning E.coli hujayralariga transformatsiyasi va tozalab olingan konstruksiya **A** – transformatsiyadan so'ng hosil bo'lgan koloniyalar; **B** – Tozalab olingan konstruksiyaning gele elektroforezi.

Yaratilgan konstruksiyalarni PZR orqali tasdiqlash uchun yengil zanjir uchun praymerlar jufti: LC_Forward: AGTTTGTCTGCTTCAGTGGGGGAC (Tm - 62ºC) hamda LC_Reverse: CACTCTGGAGAGCGTTGTCCAC (Tm - 61ºC) dizayn qilinib, sintezlandi (3A-rasm).



3-rasm. Kiritilgan genni tasdqilash. **A** – Yengil zanjirni aniqlash uchun dizaynlashgan praymerlar va ularning vektordagi joylashuvi; **B** – PZR analizi natijasida olingan DNK gel elektroforegrammasi.

Ushbu praymer yordamida PZR jarayonida kutilganidek 400-500 nukleotid juft marker oralig'ida (kutilgan mahsulot 442 nukleotid juft) DNK mahsuloti hosil bo'lgani gel elektroforezida tasdiqlandi (3B-rasm).

Foydalanilgan adabiyotlar ro'yxati:

1. Breast cancer [Online]. Available: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer.
2. Loibl, S. and Gianni, L. (2017) HER2-positive breast cancer. *The Lancet* 389, 2415–2429
3. Slamon, D.J. *et al.* (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182
4. Predictive markers in breast cancer – the present - Payne - 2008 - Histopathology -Wiley Online Library. Available: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2559.2007.02897.x.
5. Swain, S.M. *et al.* (2023) Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat. Rev. Drug Discov.* 22, 101–126
6. The Proteomics Protocols Handbook |SpringerLink[Online]. Available: https://link.springer.com/book/10.1385/1592598900.
7. Codon Optimization (ExpOptimizer) - Online Tools[Online]. Available: https://www.novoprolabs.com/tools/codon-optimization.