



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 201 962** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 12 N 15/27, C 12 P 21/02**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2001107330/13, 19.03.2001

(24) Дата начала действия патента: 19.03.2001

(46) Дата публикации: 10.04.2003

(56) Ссылки: MOTOO YAMASAKI et al., Purification and Characterization of Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor (rhG-CSF) Derivatives: KW-2228 and other Derivatives, Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998, v.68, n.8, p.1528-1534. RU 2091488 C1, 27.09.1997. RU 2108386 C1, 10.04.1998. US 5908763, 01.06.1999. US 5047504, 10.09.1991.

(98) Адрес для переписки:
630559, Новосибирская обл., Новосибирский р-н,
пгт. Кольцово, ГНЦВБ "Вектор", патентный
отдел, Ю.Н.Мистюрину

(71) Заявитель:

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"

(72) Изобретатель: Романов В.П.,
Назарикова Н.И., Жданов В.В., Афиногенова
Г.Н., Гладченко Т.Н., Пустошилова
Н.М., Масычева В.И., Синичкина
С.А., Сандахчиев Л.С., Гольдберг Е.Д., Дыгай
А.М., Поженько Н.С.

(73) Патентообладатель:

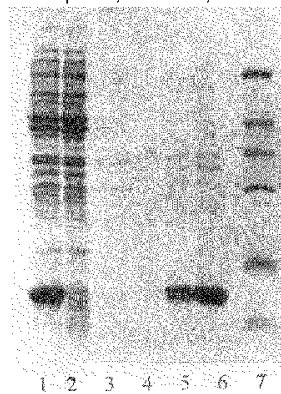
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА

(57)

Изобретение относится к биохимии и биотехнологии и может быть использовано для выделения и очистки физиологически активного рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (рчГ-КСФ). рчГ-КСФ получают из трансформированных клеток *Escherichia coli*. Тела включения, содержащие рекомбинантный фактор, растворяют мочевиной, восстановление проводят 10 мМ 2-меркаптоэтанолом. Ренатурацию осуществляют разбавлением раствора нейтральным буфером, содержащим ЭДТА, до концентрации мочевины 0,8 М. Хроматографическую очистку рчГ-КСФ проводят на двух последовательно соединенных колонках с ДЭАЭ-целлюлозой и SP-сефадексом с последующим элюированием целевого белка с колонки с SP-сефадексом в линейном градиенте

хлористого натрия в 0,02 М натрий ацетатном буфере при pH 4,4-4,5. Изобретение позволяет увеличить выход продукта с сохранением его биологической активности и чистоты. 1 з.п. ф-лы, 3 табл., 3 ил.



Фиг. 1

RU 2 201 962 C2

RU 2 201 962 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 201 962** ⁽¹³⁾ **C2**
 (51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 15/27, C 12 P 21/02**

RUSSIAN AGENCY
 FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001107330/13, 19.03.2001
 (24) Effective date for property rights: 19.03.2001
 (46) Date of publication: 10.04.2003
 (98) Mail address:
 630559, Novosibirskaja obl., Novosibirskij r-n,
 pgt. Kol'tsovo, GNTsVB "Vektor", patentnyj
 otdel, Ju.N.Mistjurinu

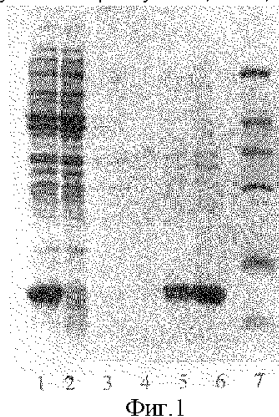
(71) Applicant:
 Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i
 biotekhnologii "Vektor"
 (72) Inventor: Romanov V.P.,
 Nazarikova N.I., Zhdanov V.V., Afinogenova
 G.N., Gladchenko T.N., Pustoshilova
 N.M., Masycheva V.I., Sinichkina
 S.A., Sandakhchiev L.S., Gol'dberg E.D., Dygaj
 A.M., Pozhen'ko N.S.
 (73) Proprietor:
 Gosudarstvennyj nauchnyj tsentr virusologii i
 biotekhnologii "Vektor"

(54) **METHOD OF PREPARING HUMAN RECOMBINANT GRANULOCYTIC COLONY-STIMULATING FACTOR**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry, biotechnology, medicine. SUBSTANCE: human recombinant granulocytic colony-stimulating factor is prepared from Escherichia coli transformed cells. Inclusion bodies comprising recombinant factor are dissolved in urea and reduction reaction is carried out with 10 mM of 2-mercaptoethanol. Renaturation is carried out by addition of EDTA-containing neutral buffer up to 0.8 M concentration of urea. Chromatography purification of recombinant factor is carried out on two successively linked columns filled with DEAE-cellulose and SP-Sephadex and the following elution of the end protein from SP-Sephadex column by linear gradient of sodium chloride in 0.02 M sodium acetate buffer, pH 4.4-4.5. Invention provides to increase the yield of product and retain its biological activity and purity. Invention

can be used for isolation and purification of physiologically active human recombinant granulocytic colony-stimulating factor. EFFECT: improved method of preparing, increased yield and purity. 2 cl, 3 tbl, 3 dwg



RU 2 201 962 C2

RU 2 201 962 C2

Изобретение относится к области биохимии и биотехнологии и представляет собой способ выделения и очистки физиологически активного рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (рчГ-КСФ), пригодного для научно-исследовательских работ и в качестве медицинского препарата.

Г-КСФ относится к группе клеточных факторов роста и играет важную роль в стимулировании пролиферации, дифференциации и функциональной активности гранулоцитсодержащих лейкоцитов крови [1], рчГ-КСФ снижает продолжительность нейтропении при химиотерапии злокачественных опухолей и трансплантации костного мозга [2, 3], укорачивает период гранулоцитопении, индуцируемой облучением [4]. Все это делает перспективным его применение в медицине.

E. coli-продуцированный рекомбинантный человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор - это 174-аминокислотная последовательность, содержащая дополнительный Met на N-конце. Молекулярная масса белка, определенная электрофорезом в денатурирующих условиях, составляет 18800 Д [5]. Молекула содержит свободный цистеин в положении 17 и две внутримолекулярные дисульфидные связи Cys³⁶-Sys⁴² и Sys⁶⁴-Sys⁷⁴ [5]. Для восстановления биологической активности рчГ-КСФ, экспрессированного в *E. coli* в виде нерастворимых тел включения, требуется ренатурация [6].

Известен способ получения Г-КСФ из клеток карциномы мочевого пузыря (линия 5737) [7, 8]. Метод включает концентрирование культуральной жидкости сульфатом аммония, диализ, хроматографию на ДЭАЭ-целлюлозе, гель-фильтрацию на Ультрагеле АсА-54 и обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). Приведенный метод позволил получить препарат с содержанием Г-КСФ более 95% (по результатам гель-электрофореза в полиакриламидном геле). Данные о выходе и содержании примесей отсутствуют.

Недостатки способа: использование соматических клеток влечет за собой повышенную трудоемкость по их сохранению и культивированию, процесс включает три хроматографические очистки, что также повышает трудоемкость процесса и понижает выход продукта. Кроме того, использование обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии требует специального оборудования.

Описан способ [7] получения рчГ-КСФ из *E. coli*, трансформированной плазмидой р536hG-CSF2. Клетки суспендируют в воде, и суспензию несколько раз продавливают в френч-прессе. Осадок отделяют центрифугированием и ресуспендируют в воде до концентрации белка 5-6 мг/мл. Осадок отделяют центрифугированием и материал осадка растворяют в 1% лаурате натрия, содержащем 50 мМ трис, рН 8,5 и 5% этанол. Нерастворимый материал отделяют центрифугированием, а супернатант наносят на колонку (С₄) ВЭЖХ. Колонку промывают 100 мМ ацетатом аммония, рН 6,0-7,0 и элюируют рчГ-КСФ градиентом изопропанола в ацетате аммония. Чистота препарата по

результатам гель-электрофореза в полиакриламидном геле более 95%. Недостатком способа является использование обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, что требует специального дорогостоящего оборудования. Данных о выходе рчГ-КСФ нет.

Наиболее близким к заявляемому способу является способ получения рекомбинантного Г-КСФ человека из клеток *Escherichia coli*, содержащих плазмиду рCfBD28 [9] (прототип). Клетки разрушают ультразвуком в трис-НСI буфере. Тела включения отделяют центрифугированием и промывают.

Отмытые тела включения растворяют в 20 мМ трис-НСI буфере, рН 8,0, содержащем 8 М мочевины.

К полученному раствору добавляют дитиотреит до концентрации 0,1 мМ и инкубируют в течение 5 ч при температуре 4 °С.

К раствору восстановленного белка для ренатурации добавляют окисленный глутатион до концентрации 0,1 мМ и инкубируют в течение ночи при температуре 4 °С.

Раствор ренатурированного белка наносят на колонку ДЭАЭ-Тойоперл, уравновешенную 10 мМ трис-НСI буфером, рН 8,0. рчГ-КСФ элюируют линейным градиентом хлористого натрия.

К элюату, содержащему рчГ-КСФ, добавляют сульфат аммония до концентрации 0,25 М, и раствор наносят на колонку Бутил-Тойоперл, уравновешенную 10 мМ трис-НСI буфером, рН 8,0, содержащим 0,25 М сульфат аммония. рчГ-КСФ элюируют раствором буфера с понижающейся концентрацией сульфата аммония.

Фракции, содержащие рчГ-КСФ, объединяют и обессоливают на колонке с сефадексом G-25 в 10 мМ фосфатном буфере, рН 7,2.

Электрофоретическая чистота получаемого рчГ-КСФ при нагрузке на гель 8 мкг препарата составила более 99%. Выход очищенного рчГ-КСФ составил 33% по отношению к количеству рчГ-КСФ в телах включения.

Недостатками способа-прототипа являются:

- использование для ренатурации специального окислителя - окисленного глутатиона;

- использование для получения очищенного рчГ-КСФ трех стадий хроматографии.

Технической задачей данного изобретения является упрощение способа, снижение потерь целевого продукта и получение препарата рчГ-КСФ с низким содержанием примесей ДНК, липополисахаридов и белков штамма-продуцента, пригодного для использования не только в научно-исследовательских работах, но и в качестве основы для создания нового лекарственного препарата [10].

Сущность предлагаемого способа заключается в следующем: биомассу рекомбинантного штамма *E. coli* SG 20050/pGGF8 [11], выращенную как описано ранее [12] и собранную центрифугированием, суспендируют в 10 мМ трис-НСI буфере, рН 8,0. Суспензию клеток обрабатывают ультразвуком в течение 5 мин и

центрифугируют в течение 20 мин.

Полученный осадок тел включения отмывают известным способом [9].

Отмытый осадок тел включения растворяют в 10 мМ трис-НСI буфере, рН 8,0, содержащем 8 М мочевины.

К раствору добавляют 2-меркаптоэтанол до концентрации 10 мМ и инкубируют в течение ночи при комнатной температуре.

рЧГ-КСФ ренатурируют путем разбавления полученного белкового раствора 10 мМ натрий фосфатным буфером, рН 8,0, содержащим 10 мМ ЭДТА и выдерживанием раствора при температуре 4-6°C в течение 20-24 ч.

К смеси ренатурированных белков добавляют уксусную кислоту до рН 4,4-4,5, разбавляют в два раза водой.

Полученный раствор ренатурированного белка наносят на две, соединенные последовательно и уравновешенные 20 мМ натрий ацетатным буфером, рН 4,4-4,5 (буфер "А"), колонки с ДЭАЭ-целлюлозой и SP-сефадексом (С-25). После нанесения всего раствора колонки промывают буфером "А". Колонку с ДЭАЭ-целлюлозой отсоединяют и элюируют рЧГ-КСФ с SP-сефадекса линейным градиентом хлористого натрия от 0 до 0,4 М в буфере "А". Фракции, содержащие рЧГ-КСФ, объединяют.

Полученный элюат диализуют против 0,05 М натрий ацетатного буфера, рН 4,4-4,5, содержащего 0,1 М хлористый натрий.

Выход электрофоретически гомогенного рЧГ-КСФ составляет 24-30 мг из 1 л культуры клеток *E. coli* SG 20050/pGGF8 (57% от количества рЧГ-КСФ в телах включения). Специфическая активность, определенная по образованию колоний нейтрофилов из клеток предшественников костного мозга мыши [13, 15], составляет 10^7-10^8 МЕ/мг белка. Содержание примесей липополисахаридов, ДНК и белков штамма-производителя соответствует требованиям Фармкомитета к качеству генно-инженерных препаратов медицинского назначения [10].

Предлагаемая схема позволяет получать препараты рЧГ-КСФ с высоким выходом и необходимой чистотой, что позволяет использовать их в качестве субстанции для создания лекарственного препарата нового поколения.

Новым по сравнению со способом-прототипом является:

- ренатурация рЧГ-КСФ разбавлением раствора тел включения нейтральным буфером, содержащим ЭДТА (вместо использования дорогостоящего окисленного глутатиона в способе-прототипе);

- одностадийная хроматографическая очистка рЧГ-КСФ на двух последовательно соединенных колонках с ДЭАЭ-целлюлозой и SP-сефадексом в градиенте концентрации соли (вместо трехстадийной в способе-прототипе).

Все это позволяет упростить способ получения рЧГ-КСФ и повысить выход конечного продукта с 33% в способе-прототипе до 57%.

Предлагаемый способ осуществлен с использованием штамма-производителя, полученного трансформацией клеток *E. coli* SG20050 плазмидой pGGF8 [11]. Биомасса клеток получена, как описано ранее [12].

Клетки разрушают ультразвуком, центрифугируют и осадок тел включения отмывают известным способом. Растворение тел включения происходит в буферном растворе, содержащем 8 М мочевины.

По результатам электрофореза полученного материала в ПААГ в присутствии SDS без обработки 2-меркаптоэтанолом нерастворимый и неактивный белок в телах включения представляет собой олигомеры, где полипептиды соединены дисульфидными связями. Для разрушения дисульфидных связей и получения мономерного белка используют восстановление 2-меркаптоэтанолом.

Полученный раствор белка для ренатурации разбавляют фосфатным буфером до концентрации мочевины 0,8 М и выдерживают раствор при температуре 4-6°C в течение 18-20 ч. В результате понижения концентрации мочевины происходит сворачивание (ренатурация) полипептидных молекул, а за счет растворенного кислорода происходит образование внутримолекулярных дисульфидных связей. Для минимизации образования межмолекулярных связей процесс проводят при температуре 4-6°C.

Для остановки процесса ренатурации и снижения количества олигомеров используют закисление смеси уксусной кислотой до рН 4,4-4,5.

Для очистки белка используют одностадийную хроматографию на двух колонках: первая с ДЭАЭ-целлюлозой, вторая с SP-сефадексом. Использование ДЭАЭ-целлюлозы позволяет сорбировать из раствора липополисахариды, нуклеиновые кислоты и белки штамма-производителя. При этом рЧГ-КСФ на первой колонке не сорбируется. На второй колонке происходит сорбция рЧГ-КСФ, при этом если часть липополисахаридов и нуклеиновых кислот не сорбировалась на ДЭАЭ-целлюлозе, то они не сорбируются и на SP-сефадексе и элюируются при промывке колонки. рЧГ-КСФ элюируют с SP-сефадекса градиентом концентрации хлористого натрия (0-0,4 М) в 0,02 М натрий ацетатном буфере, рН 4,4-4,5. Использование приведенного способа позволяет снизить потери при хроматографической очистке рЧГ-КСФ примерно на 20% по сравнению со способом-прототипом и получить рЧГ-КСФ с высоким выходом 24-30 мг/л культуры и незначительным содержанием липополисахаридов, белков штамма-производителя, ДНК.

Предлагаемое изобретение иллюстрируется фигурами графического изображения, где представлены:

Фиг.1. Электрофоретический анализ белков в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии SDS в ходе получения нерастворимых тел включения:

дорожка 1 - разрушенные клетки штамма-производителя;
 дорожка 2 - супернатант после отделения тел включения;
 дорожка 3 - супернатант после промывки 1 М LiCl с мочевиной;
 дорожка 4 - супернатант после промывки буферным раствором;
 дорожки 5, 6 - отмытые тела включения с мочевиной (5 и 10 мкг белка);
 дорожка 7 - белки-стандарты.

Фиг.2. Профиль элюции рЧГ-КСФ с колонки с SP-сефадексом.

Фиг.3. Электрофоретический анализ очищенного рЧГ-КСФ:

дорожки 1, 2 - препараты рЧГ-КСФ (по 40 мкг/гель): подготовка проб в присутствии 2-меркаптоэтанола;

дорожка 3 - белки-стандарты;

дорожки 4, 5 - препараты рЧГ-КСФ (по 40 мкг/гель): подготовка проб в отсутствие 2-меркаптоэтанола.

Примеры конкретного выполнения способа приведены ниже.

Пример 1. Разрушение клеток и получение тел включения

10 г биомассы штамма-продуцента E.coli SO 20050/pGGF8 суспендируют в 100 мл 10 мМ трис-HCl, pH 8,0. Клетки разрушают ультразвуком и суспензию центрифугируют 20 мин при температуре 4°C. Осадок тел включения отмывают раствором соли в буфере. Промывочный раствор содержит набор солюбилизованных низкомолекулярных белков, но не содержит рЧГ-КСФ (фиг.1, дорожки 3, 4). Количество белка в полученном осадке 100-120 мг (табл.2) (фиг.1, дорожки 5, 6).

Пример 2. Растворение тел включения в мочеvine и восстановление белка

К полученному в примере 1 осадку добавляют 50 мл 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, содержащего 8 М мочеvinу и интенсивно перемешивают до прозрачности. В растворе определяют концентрацию белка. К раствору добавляют 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, содержащего 8 М мочеvinу до концентрации белка 1-2 мг/мл. Для восстановления белка добавляют 2-меркаптоэтанола до концентрации 10 мМ и смесь оставляют на 18-20 ч при комнатной температуре (18-23°C).

Пример 3. Ренатурация рЧГ-КСФ

Раствор восстановленного белка, полученного в предыдущем примере, охлаждают до температуры 4-6°C и добавляют 9 объемов 10 мМ натрий фосфатного буфера, содержащего 10 мМ ЭДТА, охлажденного до указанной температуры. Полученную смесь выдерживают при температуре 4-6°C в течение 20-24 ч. К раствору ренатурированного белка при перемешивании добавляют уксусную кислоту до pH 4,4-4,5.

Пример 4. Очистка ренатурированного рЧГ-КСФ

Раствор ренатурированного белка, полученный в примере 3, разбавляют в два раза дистиллированной водой и наносят на две колонки, соединенные последовательно 1-ая 100 мл ДЭАЭ-целлюлозы, 2-ая 300 мл SP-сефадекса, уравновешенные 20 мМ натрий ацетатным буфером, pH 4,4 (буфер "А"). После нанесения колонки промывают буфером "А", колонку с ДЭАЭ-целлюлозой отсоединяют и элюируют сорбированные на SP-сефадексе белки линейным градиентом хлористого натрия от 0 до 0,4 М в буфере "А".

Фракции анализируют электрофорезом в денатурирующих условиях в 12% ПААГ. Фракции, содержащие белок с молекулярной массой 18800, объединяют.

Полученный элюат очищенного рЧГ-КСФ диализуют против 50 мМ натрий ацетатного буфера, содержащего 0,1 М хлористый натрий. Конечный объем полученного препарата составил 157 мл, концентрация

белка 0,557 мг/мл.

Суммарные данные по очистке рЧГ-КСФ из 10 г биомассы приведены в таблице 1.

Электрофоретическая чистота полученного белка рЧГ-КСФ при нагрузке на лунку 40 мкг составляет более 95% (Фиг.3).

Пример 5. Определение биологической активности препарата рЧГ-КСФ

Суспензию клеток костного мозга добавляют во флаконы, содержащие полную обогащенную среду, из расчета 10^5 клеток на 1 мл, после чего во флаконы вносят 20 мкл разбавленного раствора рЧГ-КСФ. Контрольный образец получают добавлением к суспензии клеток костного мозга в обогащенной среде 20 мкл раствора хлористого натрия с концентрацией 0,15 М. Полученные смеси разносят в лунки 24-луночного планшета в объеме 0,5 мл, используя по две лунки на каждое разведение препарата рЧГ-КСФ (от 1 до 50 нг/мл как тестируемого образца, так и стандартного препарата). Планшет с клетками инкубируют при 37°C и 100% влажности в течение 7-8 суток в атмосфере с 5% углекислого газа. По окончании инкубации проводят учет колониестимулирующей активности препаратов, подсчитывая под микроскопом число выросших в лунках колоний. Под колониями подразумевают образовавшиеся в результате культивирования очаги гемопоэза, содержащие более 50 клеток.

За 50 единиц активности принимают количество рЧГ-КСФ, которое стимулирует образование 50% от максимального количества колоний [13].

Биологическая активность полученных препаратов рЧГ-КСФ составляет 10^7 - 10^8 МЕ/мг белка.

Пример 6. Подбор концентрации раствора мочеvinы для растворения тел включения рЧГ-КСФ

40 мл равномерной суспензии тел включения в трис-HCl буфере pH 8,0 разливают по 10 мл в центрифужные пробирки и осадки отделяют центрифугированием. К полученным осадкам добавляют по 10 мл трис-HCl буфера, pH 8,0, содержащего различные концентрации мочеvinы. Осадки растворяют перемешиванием в течение 20 мин и центрифугируют. В супернатантах определяют концентрацию белка, общий белок, содержание рЧГ-КСФ, общее количество рЧГ-КСФ и выход рЧГ-КСФ относительно количества целевого белка в телах включения. Полученные результаты сведены в таблицу 2.

Исходя из полученных данных видно, что наибольшее извлечение целевого белка происходит при концентрации мочеvinы 8 М.

Пример 7. Определение количества примесей в конечном продукте

Примеси липополисахаридов определяли как описано ранее [14].

Примеси белков штамма-продуцента (E.coli SG20050/pGGF8) определяли иммуноферментным анализом с использованием поликлональных антител к белкам E. coli SG20050 [16].

Примеси ДНК определяли гибридизацией [10]. Результаты представлены в таблице 3.

Полученные данные указывают на то, что содержание примесей в рЧГ-КСФ незначительно и соответствует требованиям,

предъявляемым Минздравом к медицинским иммунобиологическим препаратам, полученным методами генетической инженерии [17].

Таким образом, использование предлагаемого способа по сравнению с прототипом позволяет упростить метод очистки целевого продукта (провести ренатурацию без использования специального окисляющего агента; осуществить хроматографическую очистку на двух сорбентах одностадийно (соединив колонки последовательно); увеличить относительный выход целевого продукта на 20% (с 33% в прототипе до 57% в предлагаемом способе) и при этом не снижается чистота продукта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Metcalf D. Blood, 1986, v. 67, No. 2, p. 257-267.
2. Morstin G., Souza L.M., Keech J., The Lancet, 1988, No. 26, p. 667-671.
3. Bronchud, M. H. , Scarffe, J.H., Thatcher, N. et al. Br. J. Cancer, 1987, v. 56, No. 6, p. 809-813.
4. Groopman, J.E., Molina, J.-M., Scadden, D.T.N. Engl. J. Med., 1989, v. 321, No. 21, p. 1449-1459.
5. Lu, H. S. , Souza, L.M., Boone, T.C., Lai, P.-H. Arch. Biochem. Biophys., 1989, v. 268, No. 1, p. 81-92.
6. Lu, H.S., Clogston, C.L., Narhi, L.O. et al. J. Biol. Chem., 1992, v. 267, No. 13, p. 8770-8777.
7. Souza, L.M., Boone, T.C., Gabilove, J., Lai, P.H. Science, 1987, v. 232, p. 61-65.
8. Welte, K. , Platzner, E., Lu, L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, v. 82, No. 5, p. 1526-1530.
9. Motoo Yamasaki et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1998, v.62, N 8, p.1528-1534.
10. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. Методические указания, МУК 4.1/4.2/588-96, М., 1998.
11. Патент РФ 2113483, кл. С 12 N 15/27, опубл. БИ 17, 1998 г.
12. Патент РФ 2158303, кл. С 12 N 1/21, опубл. БИ 30, 2000 г.
13. Nomura H., Imazeki I., Oheda M.,

Kubota M., Tamura M., Ono M., Ueyama Y., Asano S., EMBO J., 1986, v. 5, No. 5, p. 891-896.

14. Денисова Л.Я., Батурина И.И., Закабунин А.И., Афиногенова Г.Н., Пустошилова Н.М. ЖМЭИ, 1999, 5, с.109-112.

15. Гольдберг Е. Д. , Дыгай А.М., Жданов В.В. и др. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1999, т. 128, 8, с.194-199.

16. Афиногенова Г.Н., Gladchenko T.H., Веревкина К.Н., Пустошилова Н.М. Сборник трудов научных сотрудников НИКИ БАН, Бердск, 1999 г.

17. Общие требования к медицинским иммунобиологическим препаратам, полученным методами генной инженерии. РД 42-68-9-89, М., 1989.

Формула изобретения:

1. Способ получения рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (рч Г-КСФ) из трансформированных клеток Escherichia coli, содержащих рч Г-КСФ в виде нерастворимых тел включения, предусматривающий разрушение клеток продуцента, отделение, отмывку и растворение тел включения с использованием мочевины, восстановление, ренатурацию и хроматографическую очистку целевого белка, отличающийся тем, что восстановление проводят 10 мМ 2-меркаптоэтанолом, ренатурацию рч Г-КСФ проводят разбавлением раствора восстановленного белка нейтральным буфером, содержащим ЭДТА, до концентрации мочевины 0,8 М, а хроматографическую очистку рч Г-КСФ осуществляют нанесением раствора ренатурированного белка на две последовательно соединенные колонки с ДЭАЭ-целлюлозой и SP-сефадексом с последующим элюированием целевого белка с колонки с SP-сефадексом в линейном градиенте хлористого натрия (от 0 до 0,4 М) в 0,02 М натрий ацетатном буфере при pH 4,4-4,5.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что ренатурацию рч Г-КСФ осуществляют разбавлением раствора восстановленного белка фосфатным буфером при температуре 4-6°C в течение 18-20 ч.

Таблица 1

№	Стадия	Объем, мл	Белок, мг/мл	Общий белок, мг	Содержание Г-КСФ, %	Количество, Г-КСФ, мг	Выход, %
1.	Тела включения	122	2	244	62	151,28	100
2.	Белок после ренатурации	1220	0,1	122	92	112,24	74,2
3.	Очищенный белок	157	0,55	86	>95	86	56,8

Таблица 2

Концентрация мочевины в 10 мМ трис-НСl, рН 8,0	Концентрация белка, мг/мл	Извлечение белка, %	Содержание рГ-КСФ, %
2М	0,9	15	3,5
4М	1,35	20	4,7
6М	1,44	70	40
8М	1,4	95	60

Таблица 3

№ препарата	Концентрация белка, мг/мл	Примеси ЛПС, нг/мг белка	Примеси белков E. coli, нг/мг белка	Примеси ДНК, нг/мг белка
1	0,325	12	220	80
2	0,557	2	200	80
3	0,918	10,8	150	80

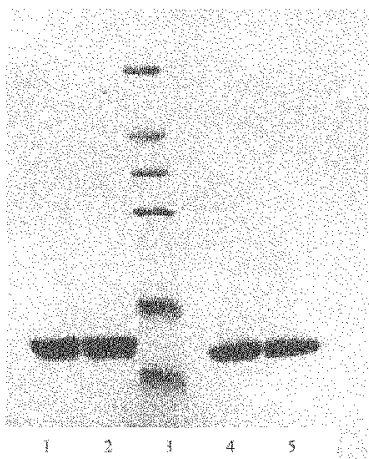
Профиль хроматографии рГ-КСФ на

SP-сефадексе



Фиг. 2

RU 2201962 C2



Фиг.3

RU 2201962 C2