



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 207 373** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁷ **C 12 N 15/27, C 07 K 14/53, A 01 K 67/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

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

(21), (22) Заявка: 2002111017/13, 25.04.2002
(24) Дата начала действия патента: 25.04.2002
(46) Дата публикации: 27.06.2003
(56) Ссылки: RU 2139084 C1, 10.10.1999.
(98) Адрес для переписки:
142712, Московская обл., Ленинский р-н, п/о
Горки Ленинские, ул. Новое шоссе, 89, кв.8,
М.И.Прокофьеву

(71) Заявитель:
ООО "Новэнерго",
Прокофьев Михаил Иванович,
Косоруков Вячеслав Станиславович
(72) Изобретатель: Прокофьев М.И.,
Городецкий С.И., Косоруков В.С., Мезина
М.Н., Букреев Ю.М., Барышников А.Ю.
(73) Патентообладатель:
ООО "Новэнерго",
Прокофьев Михаил Иванович,
Косоруков Вячеслав Станиславович

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ГРАНУЛОЦИТАРНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА

(57) Реферат:
Предложен способ получения чГ-КСФ с молоком трансгенных животных. В качестве трансгенных животных были использованы кролики с гибридным геном h-GM-1 человека, который содержит геномную копию гена гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека и регуляторные элементы

генов молока, направляющие выделение белка чГ-КСФ в молоко. Способ позволяет получать очищенный белок чГ-КСФ в гомогенном состоянии, пригодном для дальнейшего использования в фармакологии и получении лекарственной формы препарата чГ-КСФ. 4 з.п. ф-лы, 3 ил.

RU 2 207 373 C1

RU 2 207 373 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 207 373** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 15/27, C 07 K 14/53, A**
01 K 67/00

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2002111017/13, 25.04.2002

(24) Effective date for property rights: 25.04.2002

(46) Date of publication: 27.06.2003

(98) Mail address:
142712, Moskovskaja obl., Leninskij r-n, p/o
Gorki Leninskie, ul. Novoe shosse, 89, kv.8,
M.I.Prokofevu

(71) Applicant:
OOO "Novehnergo",
Prokofev Mikhail Ivanovich,
Kosorukov Vjacheslav Stanislavovich

(72) Inventor: Prokofev M.I.,
Gorodetskij S.I., Kosorukov V.S., Mezina
M.N., Bukreev Ju.M., Baryshnikov A.Ju.

(73) Proprietor:
OOO "Novehnergo",
Prokofev Mikhail Ivanovich,
Kosorukov Vjacheslav Stanislavovich

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

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, biochemistry, pharmacy. SUBSTANCE: invention proposes method for preparing human granulocytic colony-stimulating factor (hG-CSF) with milk of transgenic animals. Rabbits with human hybrid gene h-GM-1 that comprises genome copy of gene encoding human granulocytic colony- - stimulating factor and regulatory

elements of milk genes directing secretion of protein hG-CSF to milk. Method allows to prepare the purified protein hG-CSF in homogeneous state that is useful for further using in pharmacology and for preparing medicinal formulation of the preparation hG-CSF. EFFECT: improved preparing method, valuable properties of protein factor. 5 cl, 3 dwg, 4 ex

Изобретение относится к биотехнологии.

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (чГ-КСФ) является гликопротеином, состоящим из 174 аминокислот. чГ-КСФ необходим для прогрессии от плюрипотентной стволовой клетки до зрелых дифференцированных клеток крови и обладает также способностью влиять на функцию последних.

чГ-КСФ широко используется в онкологии для лечения нейтропении, а также с целью предупреждения миелосупрессии при интенсификации химиотерапии. Применение этого препарата позволяет резко уменьшить число опасных для жизни инфекционных осложнений, которые могут развиваться у больных с нейтропенией, получающих цитостатики при злокачественных немиелоидных опухолевых заболеваниях, а также при трансплантации костного мозга (Morstyn G, et al. Clinical studies with granulocytes receiving cytotoxic chemotherapy. Behring Inst. Mitt., 1988, Aug. (83), 234-239.).

Известен метод получения чГ-КСФ из таких источников, как кровь, где он присутствует в норме. Этот метод трудоемок и дорог в связи с низкой концентрацией биологически активных веществ и ограниченным количеством исходного сырья (Werner RG, Berthold W. Purification of proteins produced by biotechnological process. Arzneimittelforschung, 1988, Mart, 38(3):422-428). Другим недостатком этого метода является возможность присутствия в конечной продукции инфекционных для человека агентов, например, таких как вирусы.

Известен также способ получения чГ-КСФ с использованием рекомбинантных микроорганизмов. Обычно в качестве продуцента используется адаптированный штамм *Escherichia coli* (Perez-perez J., et al. Supplementation improves the periplasmic production of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*, Biochem. Biophys. Res. Commun, 1995, 16, 210 (2), 524-529). Однако получение рекомбинантных белков с использованием прокариот не обеспечивает таких посттрансляционных модификаций как гликолизирование, силиконирование, правильный фолдинг белка и отщепление лишнего метионина с N-конца белка, что приводит к снижению устойчивости и биологической активности получаемого препарата. В настоящее время имеется импортный препарат нейпоген (Neupogen, фирма Hoffman la Roche), который представляет собой негликолизированный рекомбинантный человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, имеющий на N-конце аминокислотной цепи дополнительный метионин. Это высокоочищенный белок биологически активен, хотя и в меньшей степени, в сравнении с его гликолизированной формой чГ-КСФ.

Известен метод получения гликолизированной формы гранулоцитарного колониестимулирующего фактора путем использования в качестве продуцента культуры клеток млекопитающих. Обычно для этого используется культура клеток яичника китайского хомячка (CHO) (Rotondaro L. et al., High-level expression of a cDNA for

human granulocyte colony - stimulating factor in Chinese Hamster ovary cells. Effect of 31-noncoding sequences mol. Biotechnol., 1997, Jun; 7(3), 231-240; Nolloway W. DNA technology in the production of glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor, Eur. J. Cancer, 1994; 30A Suppl. 3, 2-6; Nissen C. Glycosylation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: implications for stability and potency. Eur. J. Cancer, 1994, 30A, Suppl. 3, 12-14). Гликолизированная форма гранулоцитарного колониестимулирующего фактора в 2 раза превосходит по способности стимулировать рост колоний гранулоцитов и в 4 раза быстрее обеспечивает проявление положительного эффекта по сравнению с негликолизированным рекомбинантным белком, получаемым с использованием микроорганизмов.

Несмотря на то, что в рекомбинантном белке в культуре клеток млекопитающих происходят все необходимые посттрансляционные модификации, концентрация получаемого рекомбинантного белка очень низкая, а сам процесс культивирования дорогостоящий и требует высокого технологического обеспечения.

Известен метод получения рекомбинантных белков с использованием трансгенных животных, которые секретируют эти вещества с молоком (патент RU # 2157846 C1 "Способ получения трансгенного животного, экспрессирующего в молочной железе гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека и гибридный ген h-GM-1 для осуществления способа"). Метод базируется на микроинъекции генетической конструкции в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки в половые пути ложно беременной самки. Генетическая конструкция обеспечивает секрецию рекомбинантного белка только в молочной железе лактирующей трансгенной самки. Для этого структурный ген в генетической конструкции помещен под контроль регуляторных элементов генов белков молока. Этот метод, в отличие от использования культуры бактериальных клеток, обеспечивает получение высокой идентичности рекомбинантного белка нативному, выделенному из крови, и, по сравнению с использованием метода культуры клеток млекопитающих, значительно снижает стоимость получаемого продукта. Это обусловлено тем, что в молочной железе плотность продуцирующих клеток в 100 раз выше, чем в жидкой культуре: в тканях органа содержится 10^9 клеток/грамм, тогда как в культуре тканей 10^7 клеток/мл (H. Meade a. C. Ziomer, Urine as a substitute for milk. Nature Biotechnology, 1998, v. 16, January, 21-22). К тому же стоимость содержания и доения трансгенных животных составляет лишь 1/10 часть стоимости обслуживания биореактора.

Предложен способ получения гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (чГ-КСФ) с молоком трансгенных животных. Последовательность ДНК гена, кодирующего белок чГ-КСФ представлена на фиг.1.

Получение трансгенных животных является одним из наиболее перспективных

направлений для получения различных рекомбинантных белков. Существует большое количество научно-исследовательских работ, позволяющих использовать данную технологию для получения трансгенных животных-продуцентов биологически активных белков человека.

Спектр видов животных, способных выступить в роли продуцентов, достаточно широк: кролик (Brem G. et al. Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 in the mammary gland of transgenic rabbits. *Gene*, 1994, v. 149, p. 351-355), корова (Rudolph N.S. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnology*, 1999, sept., v. 17, p. 367-374; van Berkel P.H. et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature biotechnology*, 2002, v. 20, p. 484-487), коза (Ebert K.M. et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology*, 1991, v. 9, sept., p. 835-838), овца (Wright G. et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, 1991, v. 9, sept., p. 830-834), свинья (Velandier W. et al. High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, v. 89, p. 12003-12007). Использование мышей для этих целей ограничено тем, что получаемый за время лактации объем молока не превышает 2-5 мл, что абсолютно нетехнологично. С точки зрения технологии получения трансгенных животных принципиального различия между перечисленными видами нет. Во всех случаях используется микроинъектирование генетической конструкции в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки с последующей подсадки ее в половые пути синхронизированной самки-реципиента.

Введение генетического материала в животное с целью дальнейшей его экспрессии может осуществляться несколькими способами.

- Микроинъектирование раствора генетического материала в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки является наиболее ранним разработанным методом. Этим методом получено наибольшее количество трансгенных животных в мировой практике (Juhani Janne et. al. Transgenic Animals as Bioproducers of Therapeutic Proteins *Trends in Molecular Medicine, Annals of Medicine*, 1992, v. 24, p. 273-280).

- Инфекция ранних яйцеклеток, бластоцист, ранних предимплантационных эмбрионов и тканей взрослого животного (например, молочной железы) различными вирусными векторами. Наиболее часто используют ретровирусные и лентивирусные вектора (Rudolf Jaenisch. *Transgenic Animals Science*, 1988, v. 240, p. 1468-1473).

- Перенос трансфецированных ядер эмбриональных или соматических клеток в энуклеированную яйцеклетку. Метод позволяет с большой эффективностью получать заведомо трансгенных животных с

использованием заранее трансфецированной и проверенной культуры клеток соответствующего вида (Angelika E. Schnieke et. al. Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts *Science*, 1997, v. 278, p. 2130-2133).

В качестве трансгенных животных были использованы кролики с гибридным геном h-GM-1 человека, который содержит геномную копию гена гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека и регуляторные элементы генов молока, направляющие выделение белка чГ-КСФ в молоко.

Исходных трансгенных самцов спаривали с нетрансгенными самками и получили трансгенное потомство. Определение трансгенности потомства проводили методом полимеразной цепной реакции с праймерами специфичными к последовательности вектора h-GM-1. Трансгенных самок спаривали с нетрансгенными или трансгенными самцами и, после родов, собирали молоко для выделения чГ-КСФ. Сбор молока проводили ручным или машинным доением после предварительной обработки животного окситоцином.

Концентрацию и биологическую активность чГ-КСФ человека в молоке трансгенных кроликов определяли несколькими методами. Биологическую активность тестировали по степени стимулирования пролиферации и колониеобразования стволовых гранулоцитарных клеток костного мозга человека. Концентрацию белка чГ-КСФ в молоке тестировали иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител против чГ-КСФ (ELISA).

Выделение чГ-КСФ из молока трансгенных кроликов проводили следующим образом: молоко, собранное от крольчихи, центрифугировали на лабораторной центрифуге при 10 тыс. g в течение 30 минут. Удаляли жировую фракцию, отбирали супернатант и использовали его для дальнейшего выделения чГ-КСФ.

Полученный раствор разводили в два раза буфером А (20мМ фосфат калия pH 6.5, 3.5М мочевины, 200мМ ЕДТА, 0.2мМ ДТТ) и интенсивно перемешивали на мешалке для. Эти достигалось разрушение мицелл молока и превращение его в истинный раствор белков. В полученный раствор добавляли 1/5 объема насыщенного раствора сульфата аммония (4М) до конечной концентрации 1М.

Для контроля потерь белка чГ-КСФ в процессе выделения определяли его количество в растворе методом иммуноферментного анализа ELISA.

Затем полученный раствор наносили на колонку K-16 (размер 20 см) заполненную октил-сефарозой (Octyl Sepharose 4 Fast Flow, кат 17-0946-10, фирмы "Амершам-Фармация"), уравновешенной в буфере В (10 мМ фосфата калия pH 6.5, 1.8М мочевины, 10мМ ЕДТА, 1М сульфата аммония, 0.2мМ ДТТ). Скорость прохождения раствора через колонку составляла 20 мл/час.

Элюцию проводили с использованием линейного градиента с понижающейся концентрацией сульфата аммония до нуля и при повышении pH до 7.5, а детергента Tween-20 до 0.2% от буфера В к буферу С (10

мМ калий фосфата pH 6.5, 1.8М мочевины, 10мМ EDTA, 1М сульфата аммония, 0.2мМ ДТТ, 0.2% Tween-20). Скорость прохождения раствора через колонку составляла 20 мл/час. Всего собирали 22 фракции. Основная часть балластных белков выходит во фракциях 10-19. чГ-КСФ элюируется в конце градиента во фракциях 20-21. Потери активности чГ-КСФ в этом процессе составили 30%.

Элюаты, содержащие чГ-КСФ, объединяли, разводили в 4 раза буфером (2мМ фосфат калия pH 7.2, 0.15М хлорид калия), и наносили на колонку K-9 (размер 6 см) наполненную иммуносорбентом с иммобилизованными на нем моноклональными антителами против чГ-КСФ (носитель активированная бромцианом sepharose 4B фирмы "Амершам-Фармация"). Промывали колонку буфером (2мМ фосфат калия pH 7.2, 0.5М хлорид калия) около 10 объемов колонки. Элюцию с колонки проводили 0.1М лимонной кислотой.

Полученный элюат диализовали против буфера (2мМ фосфат калия pH 7.5), концентрировали различными методами и использовали для дальнейшей работы.

Пример 1

Образцы молока для тестирования на присутствие чГ-КСФ и его биологическую активность брали от трансгенных кроликов. Молоко трансгенных кроликов перед тестированием фракционировали центрифугированием для отделения жировой фракции и испытывали в различных разведениях.

Моделью для тестирования служили стволовые гемопоэтические клетки доноров костного мозга, культивируемые в полужидких питательных средах. Ядерные клетки костного мозга культивировали *in vitro* в среде RPMI 1640 с 0.3% агаром, 30% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) и содержащей необходимые компоненты для поддержания роста гемопоэтических клеток в краткосрочной культуре (14 дней) при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Результат роста клеток в соответствующих условиях оценивали по их количеству на 14 день культивирования визуальным подсчетом в камере Горяева. В качестве положительного контроля клетки культивировали с гранулоцитарным колониестимулирующим фактором человека, полученным из культуры клеток млекопитающих - стандартным коммерческим препаратом, используемым в клинической практике Granocyte (международное наименование филграстим, производство фирмы Rhone Poulenc Rorer).

Отрицательным контролем считали рост клеток в присутствии экстрактов из молока нетрансгенного кролика в соответствующих разведениях, а также без исследуемых добавок.

Одновременно прослеживали способность исследуемых клеток костного мозга в присутствии экстрактов из молока кроликов трансгенных по чГ-КСФ образовывать гранулоцитарно-макрофагальные колонии культивированием их в полужидкой среде с метилцеллюлозой (Metho Cult Medium), используемой для анализа гемопоэтических клеток на колониобразование по методу, предложенному The Terry Fox Laboratory Media Preparation Service (1992).

В качестве отрицательного контроля

использовали интактные клетки (ИТК), а в качестве положительного контроля - коммерческий препарат чГ-КСФ Granocyte в разведениях от 1:10 до 1:10000.

В культурах клеток, инкубированных с образцами экстрактов молока трансгенных кроликов, число жизнеспособных клеток в 2-3 раза превышало аналогичный показатель в контрольной интактной культуре стволовых клеток (с базовым содержанием ростового фактора) и в культуре с добавлением молока нетрансгенных кроликов.

По морфологическим признакам клетки, выращенные в культуре с добавлением экстрактов из молока трансгенных кроликов, обладали более высокой степенью дифференцировки, чем клетки в культурах с отрицательным контролем.

Ориентировочная концентрация белка чГ-КСФ, полученная на основе сравнения удельной биологической активности с препаратом Granocyte, в протестированных образцах молока составляет 50-100 мг/л в эквиваленте на активность препарата филграстим.

Пример 2

Определение концентрации чГ-КСФ иммуноферментным методом проводили в иммунологических плашках на наборе ProCon G-CSF (производство фирмы 000 "Протеиновый контур", г. Санкт-Петербург). Буфера А, В и С поставляются в составе набора.

Первые антитела (АТ-1) разводили в буфере А_р (100 мкл антител на 10 мл буферы). Вносили в лунку планшета 1 по 100 мкл раствора первых антител.

Инкубировали планшет при непрерывном встряхивании в течение одного часа при комнатной температуре. Конъюгат вторых антител (АТ-2) разводили в 20 раз в буфере С. В лунку А2 добавляли 25 мкл стандарта чГ-КСФ (0,5 мкг/мл), тщательно перемешивали и титровали кратно 2, перенося по 25 мкл в следующую ячейку и тщательно перемешивали, до лунки Е1 (до концентрации стандарта 31,25 нг/мл). Лунка А1 оставалась для отрицательного контроля. В остальные лунки планшета 2 вносили по 25 мкл образцов обезжиренного молока. Во все ячейки планшета 2, содержащие образцы стандарта и испытуемые образцы, добавляли по 100 мкл раствора вторых антител. Планшет 2 инкубировали в течение 40-60 мин при комнатной температуре при непрерывном встряхивании. Удаляли жидкость из ячеек планшета 1 и трижды промывали буфером В 300 мкл на одну ячейку (состав буфера В согласно производителя набора). Проводили полную аспирацию оставшейся жидкости. Дважды промывали ячейки планшета струей дистиллированной воды. Осушали планшет путем постукивания по поверхности лабораторного стола. Готовили раствор субстрата с красителем. Для этого смешивали в равных отношениях растворы с маркировкой "Субстрат" и "Реагент", учитывая, что на 1 стрип требуется 3,2 мл готового раствора. Вносили во все лунки по 100 мкл раствора субстрата с красителем. Инкубировали стрипы 5-15 мин при комнатной температуре на шейкере. Наблюдал развитие голубой окраски. Останавливали реакцию добавлением 50 мкл раствора 1N серной кислоты в каждую лунку. Производили

учет результатов с использованием автоматического фотометра для микропланшетов при длине волны 450 нм. Строили калибровочную кривую "оптическая плотность-концентрация" пользуясь данными по концентрациям, указанным для растворов стандартов. Определяли концентрацию чГ-КСФ в образцах.

В качестве отрицательного контроля использовали молоко нетрансгенного кролика, а в качестве положительного контроля - коммерческий препарат чГ-КСФ, Granulocyte производства фирмы Rone Poulenc Rorer.

Содержание чГ-КСФ в различных пробах молока трансгенных кроликов варьировало в пределах 20-100 мг/л.

При сравнении данных по определяемому количеству чГ-КСФ в молоке с интактными казеиновыми мицеллами и в образцах с разрушенными мицеллами было получено увеличение показаний в 1,6 раза. Это говорит о том, что значительная часть белка чГ-КСФ содержится внутри мицеллярной структуры.

Пример 3

Идентификацию чГ-КСФ в молоке трансгенных кроликов проводили методом электрофореза белков в полиакриламидном геле с последующим переносом на мембрану и окраской моноклональными антителами против чГ-КСФ конъюгированными с щелочной фосфатазой.

В качестве отрицательного контроля использовали молоко нетрансгенного кролика, а в качестве положительного - коммерческий препарат негликозилированного чГ-КСФ Neupogen (фирма Amgen).

Негликозилированная форма чГ-КСФ имеет молекулярную массу 19,6 кДа. Гликозилированная форма имеет молекулярную массу 23-24 кДа в зависимости от вариантов гликозилирования (Nicola N.A., J. Cell. physiol., 1981, 109, 253).

На электрофорез наносили обезжиренные фракции молока от трансгенных и нетрансгенных кроликов, а также положительный контроль Neupogen в чистом виде и в смеси с молоком нетрансгенного кролика (фиг.2).

После окраски мембраны специфическими антителами было обнаружено, что в пробах положительного контроля содержится белок размером около 20 кДа, а в пробах молока трансгенных кроликов содержится белок размером около 24 кДа, специфически связывающийся с моноклональными антителами против чГ-КСФ.

Данные результаты показывают, что в молоке трансгенных кроликов содержится гликозилированная форма чГ-КСФ.

Пример 4

Выделение чГ-КСФ из молока трансгенных кроликов проводили следующим образом: молоко, собранное от крольчихи, центрифугировали на лабораторной центрифуге при 10 тыс. g в течение 30 минут. Удаляли жировую фракцию, отбирали супернатант и использовали его для дальнейшего выделения чГ-КСФ.

Полученный раствор развели в два раза буфером А (20мМ фосфат калия pH 6.5, 3.5М мочевины, 200мМ EDTA, 0.2мМ ДТТ) и интенсивно перемешивали на мешалке для. Эти достигалось разрушение мицелл молока

и превращение его в истинный раствор белков. В полученный раствор добавляли 1/5 объема насыщенного раствора сульфата аммония (4М) до конечной концентрации 1М.

Для контроля потерь белка чГ-КСФ в процессе выделения определяли его количество в растворе методом иммуноферментного анализа ELISA.

Затем полученный раствор наносили на колонку К-16 (размер 20 см), заполненную октил-сефарозой (Octyl Sepharose 4 Fast Flow, кат 17-0946-10, фирмы "Амершам-Фармация"), уравновешенной в буфере В (10мМ фосфата калия pH 6.5, 1.8М мочевины, 10мМ EDTA, 1М сульфата аммония, 0.2мМ ДТТ). Скорость прохождения раствора через колонку составляла 20 мл/час.

Элюцию проводили с использованием линейного градиента с понижающейся концентрацией сульфата аммония до нуля и при повышении pH до 7.5, а детергента Tween-20 до 0.2% от буфера В к буферу С (10 мМ калий фосфата pH 6.5, 1.8М мочевины, 10мМ EDTA, 1М сульфата аммония, 0.2мМ ДТТ, 0.2% Tween-20). Скорость прохождения раствора через колонку составляла 20 мл/час. Всего собирали 22 фракции. Основная часть балластных белков выходит во фракциях 10-19. чГ-КСФ элюируется в конце градиента во фракциях 20-21. Потери активности чГ-КСФ в этом процессе составили 30%.

Элюаты, содержащие чГ-КСФ, объединяли, разводили в 4 раза буфером (2мМ фосфат калия pH 7.2, 0.15М хлорид калия), и наносили на колонку К-9 (размер 6 см), наполненную иммуносорбентом с иммобилизованными на нем моноклональными антителами против чГ-КСФ (носитель активированная бромцианом serpharose 4В фирмы "Амершам-Фармация"). Промывали колонку буфером (2мМ фосфат калия pH 7.2, 0.5М хлорид калия) около 10 объемов колонки. Элюцию с колонки проводили 0.1М лимонной кислотой.

Фракции нейтрализовали 1М гидроксида калия и образцы наносили на PAG-SDS электрофорез.

Часть проб осаждали трихлоруксусной кислотой, центрифугировали, осадки промывали 70% метанолом, растворяли в электродном буфере, доводили буфером для нанесения до требуемого объема, прогревали и наносили на гель. Окрашивали с помощью красителя Кумаси G-250 (фиг.3).

Как видно на электрофореограмме в элюате содержится две полосы белка с молекулярной массой примерно 25 000 и 50 000 дальтон. Более легкая полоса соответствует размеру гликозилированного чГ-КСФ. Минорная тяжелая полоса является димерной формой чГ-КСФ.

Данная технология может применяться для получения субстанции чГ-КСФ, используемой для приготовления лекарственной формы препарата.

Список литературы

1. Morstyn G, et al. Clinical studies with granutients receiving cytotoxic chemotherapy. Behring Inst. mitt., 1988, Aug. (83), 234-239.
2. Werner RG, Berthold W. Purification of proteins produced by biotechnological process. Arzneimittelforschung 1988 Mar; 38(3):422-428.
3. Perez-perez J., et al. Supplementation

improves the periplasmic production of human granulocyte-colony stimulating factor in *Escherichia coli*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, 16, 210 (2), 524-529.

4. Rotondaro L. et al. High-level expression of a cDNA for human granulocyte colony - stimulating factor in Chinese Hamster ovary cells. Effect of 31-noncoding sequences *mol., Biotechnol.*, 1997, Jun; 7(3) 231-240.

5. Nolloway DNA technology in the production of glycosylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor, *Eur. J. Cancer*, 1994; 30A Suppl. 3, 2.

6. Nissen C. Glycosylation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor: implications for stability and potency. *Eur. J. Cancer*, 1994, 30A, Suppl. 3, 12-14.

7. H. Meade a. C. Ziomer. Urine as a substitute for milk. *Nature Biotechnology*, 1998, v. 16, January, 21-22.

8. Патент RU #2157846 CI "Способ получения трансгенного животного, экспрессирующего в молочной железе гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека и гибридный ген h-GM-1 для осуществления способа".

9. Nicola N.A. *J. Cell. physiol.*, 1981, 109, 253.

10. Brem G. et al. Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 in the mammary gland of transgenic rabbits. *Gene*, 1994, v. 149, p. 351-355.

11. Rudolph N.S. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends in Biotechnology*, 1999, sept., v. 17, p. 367-374.

12. van Berkel P.H. et al. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature biotechnology*, 2002, v. 20, p. 484-487.

13. Ebert K.M. et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology*, 1991, v. 9, sept., p. 835-838.

14. Wright G. et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, 1991, v. 9, sept., p. 830-834.

15. Velander W. et al. High-level

expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, v. 89, p. 12003-12007.

16. Juhani Janne et. al. Transgenic Animals as Bioproducers of Therapeutic Proteins *Trends in Molecular Medicine, Annals of Medicine*, 1992, v. 24, p. 273-280.

17. Rudolf Jaenisch. *Transgenic Animals Science*, 1988, v. 240, p. 1468-1473.

18. Angelika E. Schnieke et. al. , Human Factor IX Transgenic Sheep Produced by Transfer of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts *Science*, 1997, v. 278, p. 2130-2133.

Формула изобретения:

1. Способ получения человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (чГ-КСФ), являющегося гликозилированной формой, идентичной нативному белку Г-КСФ человека, включающий стадии создания генетической конструкции ДНК, обеспечивающей экспрессию чГ-КСФ, которая несет геномные последовательности чГ-КСФ, приведенные на фиг.1, и включающей в себя некодирующие белок последовательности, введения конструкции в животное, получения трансгенного животного, продуцирующего чГ-КСФ в молоке лактирующей самки, выделения указанного чГ-КСФ, включающего центрифугирование, хроматографию и конечную доочистку целевого продукта.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что введение генетической конструкции в животное производится методами микроинъекции в ядра эмбриональных клеток, различными способами трансфекции в клетки эмбрионов или взрослого животного.

3. Способ по п.1, в котором указанным животным является кролик, корова, коза, овца, свинья.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что на стадии выделения чГ-КСФ проводят обезжиривание молока путем центрифугирования с последующей экстракцией гептаном, октаном или иным органическим растворителем, образующим с водой двухфазную структуру.

5. Способ по п.4, в котором обезжиренное молоко хроматографируют и доочищают на иммуносорбенте, несущем специфические антитела против чГ-КСФ.

50

55

60

RU 2207373 C1

RU ? 2 0 7 3 7 3 C 1

Фиг. 1

