



(51) МПК
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
A61K 35/50 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2009149599/10, 30.12.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 30.12.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.12.2009

(43) Дата публикации заявки: 10.07.2011 Бюл. № 19

(45) Опубликовано: 20.11.2011 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RIVIER J. ET AL. Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid // Biochemical and biophysical research communications, v.133, №1, 27.11.1985, pp.120-127. US 4054648 A, 18.10.1977. RU 2007419 C1, 15.02.1994. ДИКСОН М., УЭББ Э. Ферменты // Пер. с англ. - М.: Мир, 1982, с.52-55, 65, 66, 72-75.

Адрес для переписки:

414000, г.Астрахань, ул. Бакинская, 121, ГОУ ВПО Астраханская государственная медицинская академия Росздрава, инженеру-патентоведу С.А. Голубкиной

(72) Автор(ы):

Николаев Александр Аркадьевич (RU),
 Гудинская Наталья Игоревна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Астраханская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию" (ГОУ ВПО АГМА Росздрава) (RU)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ ИНГИБИНА-А ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен способ получения и очистки ингибина-А человека. Измельчают кусочки плаценты и гомогенизируют. Добавляют физиологический раствор в соотношении 1:2. К полученной массе добавляют бутиловый спирт в расчете 1:10 и оставляют на сутки в холодильнике при $t +4^{\circ}\text{C}$. Затем смесь центрифугируют с диэтиловым эфиром 1:3 в течение 10-12 минут при 5000 об/мин в рефрижераторной центрифуге двукратно. Надосадочную жидкость, содержащую ингибин, помещают в колбе в холодильник при $t +4^{\circ}\text{C}$ на сутки. Затем еще раз центрифугируют надосадочную жидкость и

определяют общий белок в ней. Полученный раствор смешивают с равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония и центрифугируют в рефрижераторной центрифуге в течение 45-50 мин при 10000 об/мин. Полученный осадок растворяют в ТРИС-НСl буфере с pH 7,8. Наносят на колонку лектин-сефарозы, уравновешенную ТРИС-НСl буфером. Пропускают весь объем растворенного осадка, полученного на предшествующей стадии. Колонку промывают 1 М раствором хлорида натрия, забуференного ТРИС-НСl буфером. Затем элюируют связанный на колонке ингибин-А 0,1 М раствором лактозы в боратном буфере pH 9,0. Элюат диализуют и концентрируют.

Способ позволяет получать ингибин-А с активностью и высокой степенью
выходом 16,3%, повышенной удельной очистки 138,8. 1 табл.

R U 2 4 3 4 0 1 8 C 2

R U 2 4 3 4 0 1 8 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 2/00 (2006.01)
A61K 35/50 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009149599/10, 30.12.2009**

(24) Effective date for property rights:
30.12.2009

Priority:

(22) Date of filing: **30.12.2009**

(43) Application published: **10.07.2011 Bull. 19**

(45) Date of publication: **20.11.2011 Bull. 32**

Mail address:

**414000, g.Astrakhan', ul. Bakinskaja, 121, GOU
VPO Astrakhanskaja gosudarstvennaja
meditsinskaja akademija Roszdrava, inzheneru-
patentovedu S.A. Golubkinov**

(72) Inventor(s):

**Nikolaev Aleksandr Arkad'evich (RU),
Gudinskaja Natal'ja Igorevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovanija
"Astrakhanskaja gosudarstvennaja meditsinskaja
akademija Federal'nogo agentstva po
zdravookhraneniju i sotsial'nomu razvitiju" (GOU
VPO AGMA Roszdrava) (RU)**

(54) METHOD OF OBTAINING AND PURIFYING HUMAN INHIBIN-A

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: disclosed is a method of obtaining and purifying human inhibin-A. Pieces of placenta are crushed and homogenised. A physiological solution is added in ratio of 1:2. Butyl alcohol is added to the obtained mass in ratio of 1:10 and then left for a day in a refrigerator at t +4°C. The mixture is then centrifuged with diethyl ether in ratio of 1:3 for 10-12 minutes at 5000 rpm in a cold centrifuge twice. Supernatant fluid containing inhibin is put into a flask which is then put into a refrigerator at t +4°C for a day. The supernatant fluid is centrifuged once more and over protein content therein is determined. The obtained solution is mixed with an equal volume of saturated ammonium

sulphate solution and centrifuged in a cold centrifuge for 45-50 min at 10000 rpm. The obtained residue is dissolved in a tris-HCl buffer with pH 7.8, and then deposited on a lectin-sepharose column balanced with tris-HCl buffer. The entire volume of the dissolved residue obtained at the previous step is passed through. The column is washed with 1M sodium chloride solution buffered with tris-HCl buffer. The inhibin bound on the column is then eluted with 0.1M lactose solution in a borate buffer at pH 9.0. The eluate undergoes dialysis and concentration.

EFFECT: method enables to obtain inhibin-A with high output, high specific activity and high degree purification.

1 tbl, 3 ex

Изобретение относится к области медицины, а именно биохимии, и может быть использовано для получения и очистки ингибина-А.

Из практики медицины известен способ выделения и очистки белка («Способ получения антимикробного пептида ареницина», заявка №2006121111/13 от 16.06.2006; патент №2316595), заключающийся в культивировании рекомбинантного штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)/pE-His8-TrxL-Ar2 в питательной среде, разрушении полученных клеток, выделении телц включения, содержащих гибридный белок His8-TrxL-Ar2; очистке гибридного белка методом аффинной хроматографии, солюбилизации белка и расщеплении бромцианом в кислой среде, разделении полученных продуктов реакции, очистке целевого продукта методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Недостатком способа является низкий выход рекомбинантного пептида, составляющий 5 мг с 1 л клеточной культуры, двукратное использование хроматографии, что повышает стоимость способа.

Известен также способ получения концентрата фактора IX системы свертывания крови из патента «Концентрат фактора IX системы свертывания крови и способ его получения», заявка №2000117508/14 от 05.07.2000; патент №2163140; включающий: сорбцию фактора IX из продуктов донорской плазмы на анионообменнике DEAE-Toyorearl, промывание анионообменника, центрифугирование, фильтрацию, сорбцию на колонке с анионообменником, элюцию в ступенчатом градиенте ионной силы 200-360 ммоль Na⁺/л 0,01-0,02 М Трис-НСl буферным раствором с рН 7,0-7,5, содержащим 0,05-0,07 М глицин и 0,05-0,06 М трехзамещенный цитрат натрия, разведение стартовым буфером (рН 7,2-7,8) до концентрации белка 0,35-0,50%, стерилизующую фильтрацию.

Недостатком указанного способа является низкий выход целевого продукта и низкая воспроизводимость, что приводит к необходимости повышения затрат на получение целевого продукта.

Известен также способ получения РНП (низкомолекулярных рибонуклеопептидов) из ядер клеток из патента «Средство, стимулирующее репарирование повреждений, обладающее ткане-, органо- и стадиспецифичностью и противовирусной активностью», заявка №2003101855/13 от 24.01.2003, патент №2238756; включающий: отмывание тканей печени крупного рогатого скота от клеток крови в физиологическом растворе, гомогенизацию при низкой температуре в течение 5 минут в растворе, содержащем 0,01 М Трис-НСl буфер рН 8,5, 0,001 М хлористого кальция, 0,001 М ЭДТА и 0,6% Тритона X-100, центрифугирование, выделение фракции цитоплазматической РНП, промывание, суспензирование в растворе ацетата натрия, содержащего 0,02 М Трис-НСl буфера рН 5,0, 0,001 М ЭДТА и 0,5% додецилсульфата натрия, приливание смеси фенол-хлороформ (1:1), прогревание в течение 10 минут на водяной бане при температуре 40°C, охлаждение, центрифугирование при 5000 об/мин в течение 20 минут, отбирание верхней фазы, приливание 350 мл смеси фенол-хлороформ (1:1), прогревание, центрифугирование, добавление равного объема ацетатного буфера и смеси фенол-хлороформ, прогревание при температуре 50°C, охлаждение, центрифугирование, последовательное повторение этой процедуры при 60, 70 и 80°C, депротеинизацию фаз центрифугатов, приливание 2,5 объема охлажденного этанола, отделение осадка, промывание этанолом, стерилизацию фильтрацией.

Недостатком данного способа является многостадийность, низкая степень его воспроизводимости в связи с невозможностью автоматизации, что затрудняет

технологический процесс и повышает стоимость целевого продукта.

Наиболее близким к заявляемому изобретению является способ «Очистки и частичной характеристики ингибина в свиной фолликулярной жидкости», описанный в журнале «Biochemical and biophysical research communications», Vol.133, №1, 1985, November 27, 1985, 120-127, заключающийся в приготовлении экстракта из биологических тканей, последовательном осаждении белка органическими растворителями и сульфатом аммония, проведением обращенно-фазовой ВЭЖХ и гель-проникающей ЖВХ.

Недостатками прототипа являются маленькие объемы (в мкл и мкг), многостадийность, двукратное использование хроматографии, низкая степень воспроизводимости, что затрудняет технологический процесс и повышает стоимость способа.

Задачей предлагаемого изобретения является упрощение технологического процесса получения и очистки ингибина-А.

Поставленная задача решается тем, что кусочки плаценты измельчают и гомогенизируют, добавляют физиологический раствор в соотношении 1:2, к полученной массе добавляют бутиловый спирт в расчете 1:10 и оставляют на сутки в холодильнике при $t +4^{\circ}\text{C}$, затем смесь центрифугируют с эфиром 1:3 в течение 10-12 минут при 5000 об/мин в рефрижераторной центрифуге двукратно, надосадочную жидкость, содержащую ингибин, помещают в колбе в холодильник при $t +4^{\circ}\text{C}$ на сутки, затем еще раз центрифугируют и определяют общий белок в надосадочной жидкости, полученный раствор смешивают с равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония и центрифугируют в рефрижераторной центрифуге в течение 45-50 мин при 10000 об/мин, полученный осадок растворяют в ТРИС-НСI буфере с рН 7,8, наносят на колонку лектин-сефарозы, уравновешенную ТРИС-НСI буфером, пропускают весь объем растворенного осадка, полученного на предшествующей стадии, колонку промывают 1 М раствором хлорида натрия, забуференного ТРИС-НСI буфером, затем элюируют связанный на колонке ингибин-А 0,1 М раствором лактозы в боратном буфере рН 9,0, элюат диализуют и концентрируют.

Предлагаемый способ получения и очистки ингибина-А человека успешно апробирован на 63 образцах плаценты человека в практической работе кафедры общей и биоорганической химии Астраханской государственной медицинской академии в течение 2009 года.

Предлагаемый способ осуществляется следующим образом.

Первичный экстракт плаценты

Для приготовления экстракта кусочки плаценты измельчали и гомогенизировали, добавляя физиологический раствор в соотношении 1:2. (Общий объем 1200 мл, общий белок 31640 мг, ингибина-А 164 мг, выход 100%, степень очистки 1.)

Бутанольная фракция

К полученной массе добавляли бутиловый спирт в расчете 1:10 и оставляли на сутки в холодильнике ($+4^{\circ}\text{C}$). Затем смесь центрифугировали с диэтиловым эфиром (1 часть эфира и 3 части гомогената) в течение 10 минут при 5000 об/мин в рефрижераторной центрифуге двукратно. Надосадочную жидкость (445 мл), содержащую ингибин, помещали в колбе в холодильник ($+4^{\circ}\text{C}$) на сутки. Затем еще раз центрифугировали и определяли общий белок в надосадочной жидкости (7680 мг), количество ингибина-А 95 мг.

Выход 57,9%, степень очистки 2,3.

Преципитация сульфатом аммония

Полученный раствор смешивали с равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге в течение 45 мин при 10000 об/мин. Полученный осадок растворяли в ТРИС-НСI буфере с рН 7,8. (Общий объем 115 мл, общий белок 855 мг, количество ингибина-А 73 мг, выход 44,5%,
5 степень очистки 16,5.)

Аффинная хроматография

Эта стадия очистки ингибина-А основана на обнаруженной нами способности лектина клещевины (рицина) преципитировать ингибин-А. Представляет собой
10 аффинную хроматографию ингибина-А на иммобилизованном лектине клещевины. Через колонку (2×14 см) лектин-сефарозы, уравновешенную ТРИС-НСI буфером, пропускали весь объем растворенного осадка, полученного на предшествующей стадии. Далее колонку промывали 1 М раствором хлорида натрия, забуференного
15 ТРИС-НСI буфером, а затем элюировали связанный на колонке ингибин-А 0,1 М раствором лактозы в боратном буфере рН 9,0. Полученный элюат диализовали и концентрировали до объема 13 мл (общий белок 32 мг, количество ингибина-А 27 мг, выход 16,3%, степень очистки 138,8).

Примеры с использованием разных эфиров

Пример 1

Первичный экстракт плаценты

Для приготовления экстракта кусочки плаценты измельчали и гомогенизировали, добавляя физиологический раствор в соотношении 1:2. (Общий объем 1200 мл, общий белок 31640 мг, ингибина-А 164 мг, выход 100%, степень очистки 1.)
25

Бутанольная фракция

К полученной массе добавляли бутиловый спирт в расчете 1:10 и оставляли на сутки в холодильнике (+4°C). Затем смесь центрифугировали с дипропиловым эфиром (1 часть эфира и 3 части гомогената) в течение 10 минут при 5000 об/мин в
30 рефрижераторной центрифуге двукратно. Надосадочную жидкость (445 мл), содержащую ингибин, помещали в колбе в холодильник (+4°C) на сутки. Затем еще раз центрифугировали и определяли общий белок в надосадочной жидкости (7680 мг), количество ингибина-А 95 мг.

Выход 57,9%, степень очистки 2,3.

Преципитация сульфатом аммония

Полученный раствор смешивали с равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге в течение 45 мин при 10000 об/мин. Полученный осадок растворяли в ТРИС-НСI буфере с рН 7,8.
40 (Общий объем 115 мл, общий белок 855 мг, количество ингибина-А 73 мг, выход 44,5%, степень очистки 16,5.)

Аффинная хроматография

Эта стадия очистки ингибина-А основана на обнаруженной нами способности лектина клещевины (рицина) преципитировать ингибин-А. Представляет собой
45 аффинную хроматографию ингибина-А на иммобилизованном лектине клещевины. Через колонку (2×14 см) лектин-сефарозы, уравновешенную ТРИС-НСI буфером, пропускали весь объем растворенного осадка, полученного на предшествующей стадии. Далее колонку промывали 1 М раствором хлорида натрия, забуференного
50 ТРИС-НСI буфером, а затем элюировали связанный на колонке ингибин-А 0,1 М раствором лактозы в боратном буфере рН 9,0. Полученный элюат диализовали и концентрировали до объема 13 мл (общий белок 32 мг, количество ингибина-А 27 мг, выход 16,3%, степень очистки 138,8).

Пример 2

Первичный экстракт плаценты

Для приготовления экстракта кусочки плаценты измельчали и гомогенизировали, добавляя физиологический раствор в соотношении 1:2. (Общий объем 1200 мл, общий белок 31640 мг, ингибина-А 164 мг, выход 100%, степень очистки 1.)

Бутанольная фракция

К полученной массе добавляли бутиловый спирт в расчете 1:10 и оставляли на сутки в холодильнике (+4°C). Затем смесь центрифугировали с этилпропиловым эфиром (1 часть эфира и 3 части гомогената) в течение 12 минут при 5000 об/мин в рефрижераторной центрифуге двукратно. Надосадочную жидкость (445 мл), содержащую ингибин, помещали в колбе в холодильник (+4°C) на сутки. Затем еще раз центрифугировали и определяли общий белок в надосадочной жидкости (7680 мг), количество ингибина-А 95 мг.

Выход 57,9%, степень очистки 2,3.

Преципитация сульфатом аммония

Полученный раствор смешивали с равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге в течение 50 мин при 10000 об/мин. Полученный осадок растворяли в ТРИС-НСI буфере с рН 7,8. (Общий объем 115 мл, общий белок 855 мг, количество ингибина-А 73 мг, выход 44,5%, степень очистки 16,5.)

Аффинная хроматография

Эта стадия очистки ингибина-А основана на обнаруженной нами способности лектина клещевины (рицина) преципитировать ингибин-А. Представляет собой аффинную хроматографию ингибина-А на иммобилизованном лектине клещевины. Через колонку (2×14 см) лектин-сефарозы, уравновешенную ТРИС-НСI буфером, пропускали весь объем растворенного осадка, полученного на предшествующей стадии.

Далее колонку промывали 1 М раствором хлорида натрия, забуференного ТРИС-НСI буфером, а затем элюировали связанный на колонке ингибин-А 0,1 М раствором лактозы в боратном буфере рН 9,0. Полученный элюат диализовали и концентрировали до объема 13 мл (общий белок 32 мг, количество ингибина-А 27 мг, выход 16,3%, степень очистки 138,8).

Пример 3

Первичный экстракт плаценты

Для приготовления экстракта кусочки плаценты измельчали и гомогенизировали, добавляя физиологический раствор в соотношении 1:2. (Общий объем 1200 мл, общий белок 31640 мг, ингибина-А 164 мг, выход 100%, степень очистки 1.)

Бутанольная фракция

К полученной массе добавляли бутиловый спирт в расчете 1:10 и оставляли на сутки в холодильнике (+4°C). Затем смесь центрифугировали с уксусноэтиловым эфиром (1 часть эфира и 3 части гомогената) в течение 11 минут при 5000 об/мин в рефрижераторной центрифуге двукратно. Надосадочную жидкость (445 мл), содержащую ингибин, помещали в колбе в холодильник (+4°C) на сутки. Затем еще раз центрифугировали и определяли общий белок в надосадочной жидкости (7680 мг), количество ингибина-А 95 мг.

Выход 57,9%, степень очистки 2,3.

Преципитация сульфатом аммония

Полученный раствор смешивали с равным объемом насыщенного раствора

сульфата аммония и центрифугировали в рефрижераторной центрифуге в течение 50 мин при 10000 об/мин. Полученный осадок растворяли в ТРИС-НСI буфере с рН 7,8 (общий объем 115 мл, общий белок 855 мг, количество ингибина-А 73 мг, выход 44,5%, степень очистки 16,5).

Аффинная хроматография

Эта стадия очистки ингибина-А основана на обнаруженной нами способности лектина клещевины (рицина) преципитировать ингибин-А. Представляет собой аффинную хроматографию ингибина-А на иммобилизованном лектине клещевины. Через колонку (2×14 см) лектин-сефарозы, уравновешенную ТРИС-НСI буфером, пропускали весь объем растворенного осадка, полученного на предшествующей стадии. Далее колонку промывали 1 М раствором хлорида натрия, забуференного ТРИС-НСI буфером, а затем элюировали связанный на колонке ингибин-А 0,1 М раствором лактозы в боратном буфере рН 9,0. Полученный элюат диализовали и концентрировали до объема 13 мл (общий белок 32 мг, количество ингибина-А 27 мг, выход 16,3%, степень очистки 138,8).

Из приведенных примеров видно, что выход и степень очистки от применения разных эфиров не изменяются. Использование разных эфиров не влияет на конечный продукт, так как эфир используется для удаления липидных фракций и повышает выход белковых компонентов. В своих исследованиях мы использовали диэтиловый эфир как наиболее дешевый и доступный.

Достигнут положительный эффект: разработан способ, характеризующийся упрощением технологического процесса, повышением выхода целевого продукта, увеличением объемов, уменьшением количества стадий и снижением стоимости целевого продукта, а также получен ингибин-А с высокой степенью очистки (138,8), повышенной удельной активностью и характеристиками (см. таблицу).

Стадия очистки	Общий объем, содержащий ингибин-А	Общий белок, мг	Количество ингибина-А, мг	Выход, %	Степень очистки
Первичный экстракт плаценты	1200 мл	31640	164	100	1
Бутанольная фракция	445 мл	7680	95	57,9	2,3
Преципитация сульфатом аммония	115 мл	855	73	44,5	16,5
Аффинная хроматография	13 мл	32	27	16,3	138,8

Формула изобретения

Способ получения и очистки ингибина-А, заключающийся в приготовлении экстракта из биологических тканей, последовательном осаждении белка органическими растворителями и сульфатом аммония, проведением хроматографии, отличающийся тем, что кусочки плаценты измельчают и гомогенизируют, добавляют физиологический раствор в соотношении 1:2, к полученной массе добавляют бутиловый спирт в расчете 1:10 и оставляют на сутки в холодильнике при t +4°C, затем смесь центрифугируют с диэтиловым эфиром 1:3 в течение 10-12 мин при 5000 об/мин в рефрижераторной центрифуге двукратно, надосадочную жидкость, содержащую ингибин, помещают в колбе в холодильник при t +4°C на сутки, затем еще раз центрифугируют и определяют общий белок в надосадочной жидкости, полученный раствор смешивают с равным объемом насыщенного раствора сульфата аммония и центрифугируют в рефрижераторной центрифуге в течение 45-50 мин при 10000 об/мин, полученный осадок растворяют в ТРИС-НСI буфере с рН 7,8, наносят на

5 колонку лектин-сефарозы, уравновешенную ТРИС-НСI буфером, пропускают весь объем растворенного осадка, полученного на предшествующей стадии, колонку промывают 1М раствором хлорида натрия, забуференного ТРИС-НСI буфером, затем элюируют связанный на колонке ингибин-А 0,1М раствором лактозы в боратном буфере рН 9,0, элюат диализуют и концентрируют.

10

15

20

25

30

35

40

45

50