

Изобретение относится к промышленности биоактивных веществ и может быть использовано в биотехнологических производствах, медицине и для исследовательских работ.

Фактор роста нервной ткани (ФРНТ) усиливает рост и дифференцировку симпатических и эмбриональных нервных клеток.

Известны способы выделения ФРНТ из тканей животных, например, слюнной железы или плаценты. (См. Angeletti R.H. Bradshaw R.A.

Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence. - Proc. Natl. Acad. Sc. USA., 1971, 68, 2417-2420)

Однако, получение ФРНТ из тканей животных очень трудоемко и не обеспечивает чистоту продукта, так как источники препарата представляют собой многокомпонентную смесь различных белковых и небелковых компонентов, разделение которых является сложной задачей. Наиболее эффективным источником ФРНТ являются змеиные яды, которые содержат только белковые компоненты и имеют стабильный состав.

Состав яда различных змей варьирует, это связано с видовой специфичностью ядов, а также с местом обитания и условиями существования. Сильно отличаются как физико-химические, так и структурно-функциональные свойства ФРНТ, выделенных из яда различных видов змей. Так изоэлектрическая точка (pI) колеблется в диапазоне 6,8-10,5, молекулярная масса - 13-37 kDa, фактор может быть одно- или двухсубъединичным белком, а выраженная биологическая активность колеблется в интервале концентраций от 1 до 120 нг/мл [см. Хамидов Д.Х., Юкельсон Л.Я., Салихов Р.С., Хафизова М.Г. Выделение и характеристика фактора роста нервов из яда среднеазиатской эфы *Echis multisquamatus*. - Биохимия, 1989, т.54, вып.6, 987-991]. В связи с этим получение ФРНТ из яда различных змей, с одной стороны, является самостоятельной научной задачей, а, с другой стороны, расширяет возможности широкомасштабного его производства.

Наиболее близким к изобретению по технической сущности является "Способ выделения фактора роста нервной ткани из змеиного яда" по авт. св. СССР №1055732, C07G7/00; A61K35/58, 1983, БИ №43.

Этот способ предусматривает растворение яда гюрзы (*Vipera lebetina*) в буферном растворе - 0,19-0,21 М растворе уксуснокислого аммония (рН 6,4-6,6) с последующим центрифугированием, гельфильтрацию полученной надосадочной жидкости на Сефадексе G-100 в присутствии того же буферного раствора и ионообменную хроматографию на колонке с карбоксиметилцеллюлозой KM-52 с использованием линейного градиента с повышающейся ионной силой 0,95-1,05 М уксуснокислого аммония рН 6,4-6,6.

Получают препарат ФРНТ с биологической активностью  $5 \times 10^8$  г/мл и выходом 1,5 % по белку.

Однако, использование в пилотном производстве яда одного вида змеи, тем более, если рынок сырья ограничен, а стоимость его достаточно высока, заставляет использовать в качестве дополнительных источников сырья яды других змей, количество и рыночная стоимость которых удовлетворяет широкомасштабное пилотное производство.

В основу изобретения поставлена задача разработать способ выделения фактора роста нервной ткани из змеиного яда, позволяющий путем использования в качестве исходного сырья яда щитомордника, проведения ионообменной хроматографии в 2 стадии перед гельфильтрацией и применения носителей, обладающих высокими хроматографическими свойствами и физико-химической стабильностью, расширить ассортимент сырья, получить высокоочищенный ФРНТ и сократить время производства.

Поставленная задача решается в способе выделения ФРНТ из змеиного яда, включающем растворение яда в буферном растворе с последующим центрифугированием, гельфильтрацию, ионообменную хроматографию с использованием элюента с повышенной ионной силой, объединение фракций, содержащих биологическую активность ФРНТ, и лиофильную сушку, в котором, согласно изобретению, в качестве исходного сырья используют яд щитомордника, ионообменную хроматографию проводят перед гельфильтрацией и осуществляют ее в две стадии на колонке с носителем Соурс 15S, используя на первой стадии в качестве буферного раствора 0,14-0,16 М раствор уксуснокислого натрия с рН 6,3-6,5, а в качестве элюента - указанный раствор с концентрацией 0,27-0,29 М, полученный элюат разбавляют в 4-5 раз дистиллированной водой и повторно хроматографируют на колонке с тем же носителем, но в 13 раз меньшей по объему, используя в качестве буферного раствора 0,045-0,055 М раствор уксуснокислого натрия с рН 5,0-5,2, а в качестве элюента тот же раствор с концентрацией 0,95-1,05 М и рН 6,4-6,6 после чего проводят гельфильтрацию полученного элюата на Супердексе G-75 с 0,19-0,21 М раствором бикарбоната аммония при рН 6,4-6,6.

Поставленная задача решается заявляемым способом, когда параметры процесса выделения ФРНТ находятся в пределах, указанных в формуле изобретения. При изменении параметров в сторону увеличения или уменьшения характеристики получаемого продукта ухудшаются.

Проведение ионообменной хроматографии в 2 стадии перед гельфильтрацией на колонке с носителем Соурс 15S позволяет максимально очистить и сконцентрировать ФРНТ в минимальном объеме, что предполагает использование на стадии гельфильтрации колонки с Супердексом G-75 меньшего размера, увеличение скорости элюции и, как следствие, сокращает время производственного цикла с 6 суток в прототипе до 23 часов в заявляемом способе.

Физико-химическая стабильность носителей типа Соурс 15S и Супердекс G-75 гораздо выше, чем у целлюлозы KM-52 и Сефадекса G-100, что позволяет проводить значительно большее количество производственных циклов без заметных изменений характеристик колонки.

Использование в качестве исходного сырья яда щитомордника, рыночная стоимость которого почти в 15 раз ниже яда гюрзы, позволяет расширить сырьевую базу широкомасштабного пилотного производства ФРНТ.

Изобретение иллюстрируется примерами 1-3 конкретного осуществления способа и таблицей сравнительных данных способа и прототипа.

Пример 1. К 12,0 г яда щитомордника добавляют 200 мл 0,14 М раствора уксуснокислого натрия с pH 6,5, смесь перемешивают 30 минут при 4°C. Растворенный яд центрифугируют при 5000 об/мин при 4°C в течение 15 минут. Осадок выбрасывают, а к надосадочной жидкости добавляют равный объем раствора 0,14 М уксуснокислого натрия с pH 6,5, перемешивают и используют для ионообменной хроматографии. Раствор яда наносят на уравновешенную 0,14 М раствором уксуснокислого натрия (pH 6,5) колонку с Соурс 15S (размер колонки 5x4 см, объем - 80 мл). Через колонку пропускают 2,0 л 0,14 М раствора уксуснокислого натрия с pH 6,5. Скорость нанесения и элюции 30 см/час (10 мл/мин) Оптическую плотность регистрируют непрерывно с помощью проточного монитора UV-1 (фирма "Pharmacia Biotech AB" (Швеция)). Основная часть белков (свыше 90 %) в данных условиях не адсорбируется на катионообменнике, а ФРНТ, имеющий изоэлектрическую точку выше 8,0, связывается с Соурс 15S и его элюируют ступенчатым градиентом ионной силы 0,28 М уксуснокислого натрия с pH 6,5. Белковый пик, содержащий активность ФРНТ собирают (116 мл), разбавляют в 5 раз дистиллированной водой, подводят pH до значения 5,0 и наносят на концентрирующую колонку с Соурс 15S (размер колонки 1,6x3 см, объем - 6 мл), уравновешенную 0,05 М раствором уксуснокислого натрия с pH 5,0, со скоростью 300 см/час (10 мл/мин). Оптическую плотность регистрируют непрерывно с помощью проточного монитора UV-1 (фирма "Pharmacia Biotech AB" (Швеция)). Через колонку пропускают 20 мл 0,05 М раствора уксуснокислого натрия с pH 5,0. В выбранных условиях весь белок адсорбируется на носителе и его элюируют ступенчатым градиентом 0,95 М раствора уксуснокислого натрия с pH 6,5. Весь белковый пик (6,4 мл) собирают и используют для гельфильтрации. Гельфильтрацию проводят на колонке с Супердексом G-75 (2,6x96 см), уравновешенной 0,2 М раствором бикарбоната аммония (pH 6,5). Колонку элюируют 0,2 М раствором бикарбоната аммония со скоростью 10 см/час (50 мл/час). Оптическую плотность регистрируют непрерывно с помощью проточного монитора UV-1 (фирма "Pharmacia Biotech AB" (Швеция)). Белковый пик, содержащий биологическую активность собирают (22 мл) и высушивают лиофильно.

Характеристика препарата:

Выход, мг	22,80 мг (0,19% по белку)
Выход по активности, %	98,0%
Биологическая активность	$6,0 \times 10^{-8}$ г/мл
Степень очистки, раз	526

Пример 2. К 11,9 г яда щитомордника добавляют 200 мл 0,15 М раствора уксуснокислого натрия с pH 6,4, смесь перемешивают 30 минут при 4°C. Растворенный яд центрифугируют при 5000 об/мин при 4°C в течение 15 минут. Осадок выбрасывают, а к надосадочной жидкости добавляют равный объем раствора 0,15 М уксуснокислого натрия с pH 6,4, перемешивают и используют для ионообменной хроматографии. Раствор яда наносят на уравновешенную 0,15 М раствором уксуснокислого натрия (pH 6,4) колонку с Соурс 15S (размер колонки 5x4 см, объем - 80 мл). Через колонку пропускают 2,0 л 0,15 М раствора уксуснокислого натрия с pH 6,4. Скорость нанесения и элюции 30 см/час (10 мл/мин). Оптическую плотность регистрируют непрерывно с помощью проточного монитора UV-1 (фирма "Pharmacia Biotech AB" (Швеция)). Основная часть белков (свыше 90 %) в данных условиях не адсорбируется на катионообменнике, а ФРНТ, имеющий изоэлектрическую точку выше 8,0, связывается с Соурс 15S и его элюируют ступенчатым градиентом ионной силы 0,29 М уксуснокислого натрия с pH 6,4. Белковый пик, содержащий активность ФРНТ, собирают (112 мл), разбавляют в 4,5 раза дистиллированной водой, подводят pH до значения 5,1 и наносят на концентрирующую колонку с Соурс 15S (размер колонки 1,6x3 см, объем - 6 мл), уравновешенную 0,055 М раствором уксуснокислого натрия с pH 5,1, со скоростью 300 см/час (10 мл/мин). Оптическую плотность регистрируют непрерывно с помощью проточного монитора UV-1 (фирма "Pharmacia Biotech AB" (Швеция)). Через колонку пропускают 20 мл 0,055 М раствора уксуснокислого натрия с pH 5,1. В выбранных условиях весь белок адсорбируется на носителе и его элюируют ступенчатым градиентом 1,05 М раствора уксуснокислого натрия с pH 6,6. Весь белковый пик (6,2 мл) собирают и используют для гельфильтрации. Гельфильтрацию проводят на колонке с Супердексом G-75 (2,6x96 см), уравновешенной 0,21 М раствором бикарбоната аммония (pH 6,6). Колонку элюируют 0,21 М раствором бикарбоната аммония со скоростью 10 см/час (50 мл/час). Оптическую плотность регистрируют непрерывно с помощью проточного монитора UV-1 (фирма "Pharmacia Biotech AB" (Швеция)). Белковый пик, содержащий биологическую активность собирают (21 мл) и высушивают лиофильно.

Характеристика препарата:

Выход, мг	22,40 мг (0,2% по белку)
Выход по активности, %	97%
Биологическая активность	$5,0 \times 10^{-8}$ г/мл
Степень очистки, раз	535

Пример 3. К 12,1 г яда щитомордника добавляют 200 мл 0,16 М раствора уксуснокислого натрия с pH 6,3, смесь перемешивают 30 минут при 4°C. Растворенный яд центрифугируют при 5000 об/мин при 4°C в течение 15 минут. Осадок выбрасывают, а к надосадочной жидкости добавляют равный объем раствора 0,16 М уксуснокислого натрия с pH 6,3, перемешивают и используют для ионообменной хроматографии.

Раствор яда наносят на уравновешенную 0,16 М раствором уксуснокислого натрия (рН 6,3) колонку с Соурс 15S (размер колонки 5х4 см, объем - 80 мл). Через колонку пропускают 2,0 л 0,16 М раствора уксуснокислого натрия с рН 6,3. Скорость нанесения и элюции 30 см/час (10 мл/мин). Оптическую плотность регистрируют непрерывно с помощью проточного монитора UV-1 (фирма "Pharmacia Biotech AB" (Швеция)). Основная часть белков (свыше 90%) в данных условиях не адсорбируется на катионообменнике, а ФРНТ, имеющий зoeлектрическую точку выше 8,0, связывается с Соурс 15S и его элюируют ступенчатым градиентом ионной силы 0,27 М уксуснокислого натрия с рН 6,3. Белковый пик, содержащий активность ФРНТ собирают (121 мл), разбавляют в 4 раза дистиллированной водой, подводят рН до значения 5,0 и наносят на концентрирующую колонку с Соурс 15S (размер колонки 1,6х3 см, объем - 6 мл), уравновешенную 0,045 М раствором уксуснокислого натрия с рН 5,2, со скоростью 300 см/час (10 мл/мин). Оптическую плотность регистрируют непрерывно с помощью проточного монитора UV-1 (фирма "Pharmacia Biotech AB" (Швеция)). Через колонку пропускают 20 мл 0,045 М раствора уксуснокислого натрия с рН 5,2. В выбранных условиях весь белок адсорбируется на носителе и его элюируют ступенчатым градиентом 1,0 М раствора уксуснокислого натрия с рН 6,4. Весь белковый пик (6,4 мл) собирают и используют для гельфильтрации. Гельфильтрацию проводят на колонке с Супердексом G-75 (2,6х96 см), уравновешенной 0,19 М раствором бикарбоната аммония (рН 6,4). Колонку элюируют 0,19 М раствором бикарбоната аммония со скоростью 10 см/час (50 мл/час). Оптическую плотность регистрируют непрерывно с помощью проточного монитора UV-1 (фирма "Pharmacia Biotech AB" (Швеция)). Белковый пик, содержащий биологическую активность собирают (25 мл) и высушивают лиофильно.

Характеристика препарата:

Выход, мг	22,80 мг (0,19% по белку)
Выход по активности %	96,5%
Биологическая активность	$6,0 \times 10^{-8}$ г/мл
Степень очистки, раз	531

Таблица

Сравнительные данные предлагаемого способа и прототипа

Сравнительные параметры	Прототип	Предлагаемый способ
Время производственного цикла	≈ 6 суток	менее 24 часов
Количество перерабатываемого сырья в неделю	5 г	72 г
Стоимость 1 г исходного сырья	≈ 1200 \$	80 \$
Стоимость сырья, перерабатываемого за неделю	6000 \$	5760 \$
Выход продукта за 6-дневную рабочую неделю	78 мг	136 мг
Выход по активности	98,1 %	97,2 %
Биологическая активность	$5,3 \times 10^{-8}$ г/мл	$5,7 \times 10^{-8}$ г/мл

39983

Как следует из результатов, представленных в таблице, за одну рабочую неделю (6 суток взято с учетом одного цикла выделения в прототипе) в прототипе и заявляемом способе расходуется сырьё практически на одинаковую сумму, однако за счет большего количества производственных циклов выход конечного продукта в заявляемом способе практически в 2 раза больше. Это перекрывает дополнительные расходы на реактивы, стоимость которых относительно низкая. При этом характеристики ФРНТ в прототипе и заявляемом способе практически одинаковые, что делает процесс крупномасштабного пилотного производства более рентабельным и расширяет его сырьевую базу.