



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

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009144398/10, 30.11.2009**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.11.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **30.11.2009**(45) Опубликовано: **10.04.2011** Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2368621 C1, 27.09.2009. ИЛЬИНА А.Р. и др.: «Актинопорины из актинии японского моря *Oulactis orientalis*: выделение и частичная характеристика». Биоорганическая химия, 2005, Т.31, №1, стр.39-48.**

Адрес для переписки:

690022, г.Владивосток, пр-кт 100-летия Владивостока, 159, Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, зав. патентным отделом Н.И. Стадниченко

(72) Автор(ы):

**Монастырная Маргарита Михайловна (RU),
Чаусова Виктория Евгеньевна (RU),
Гладких Ирина Николаевна (RU),
Лейченко Елена Владимировна (RU),
Козловская Эмма Павловна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**ТИХООКЕАНСКИЙ ИНСТИТУТ
БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ТИБОХ ДВО РАН) (RU)**

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПОЛИПЕПТИДА ИЗ АКТИНИИ HETERACTIS CRISPA, ОБЛАДАЮЩЕГО АНАЛЬГЕТИЧЕСКИМ ДЕЙСТВИЕМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к способам получения полипептидов, обладающих выраженным анальгетическим действием. Способ включает гомогенизацию актинии *Heteractis crispa*, этанольную экстракцию полипептидов, гидрофобную хроматографию на полихrome-1, последующую

очистку целевого продукта ионообменной хроматографией и обращенно-фазовой ВЭЖХ. Гидрофобную хроматографию на полихrome-1 осуществляют в статическом варианте, а ионообменную хроматографию осуществляют на Cellulose CM-32. Изобретение позволяет увеличить выход целевого продукта в 12 раз. 2 ил., 1 табл.

RU 2 4 1 5 8 6 6 C 1

RU 2 4 1 5 8 6 6 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C07K 14/435 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2009144398/10, 30.11.2009

(24) Effective date for property rights:
30.11.2009

Priority:

(22) Date of filing: 30.11.2009

(45) Date of publication: 10.04.2011 Bull. 10

Mail address:

690022, g. Vladivostok, pr-kt 100-letija
Vladivostoka, 159, Tikhookeanskij institut
bioorganicheskoj khimii DVO RAN, zav.
patentnym otdelom N.I. Stadnichenko

(72) Inventor(s):

Monastyrnaja Margarita Mikhajlovna (RU),
Chausova Viktorija Evgen'evna (RU),
Gladkikh Irina Nikolaevna (RU),
Lejchenko Elena Vladimirovna (RU),
Kozlovskaja Ehmma Pavlovna (RU)

(73) Proprietor(s):

TIKHOKEANSKIJ INSTITUT
BIOORGANICHESKOJ KHIMII
DAL'NEVOSTOCHNOGO OTDELENIJa
ROSSIJSKOJ AKADEMII NAUK (TIBOKh
DVO RAN) (RU)

(54) METHOD FOR PRODUCING POLYPEPTIDE OF ACTINIA HETERACTIS CRISPA EXHIBITING ANALGESIC ACTION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method involves homogenization of actinia Heteractis crispa, ethanol extraction of polypeptides, polychrome-1 hydrophobic chromatography, following purification of an end product by ion-exchange chromatography and reverse

phase HPLC. Polychrome-1 hydrophobic chromatography is conducted in a static version, while ion-exchange chromatography is conducted on Cellulose CM-32.

EFFECT: end product yield higher in 12 times.
2 dwg, 1 tbl, 1 ex

RU 2 4 1 5 8 6 6 C 1

RU 2 4 1 5 8 6 6 C 1

Изобретение относится к области медицины, конкретно к способам получения полипептидов, обладающих выраженным анальгетическим действием.

Известно, что ядовитые морские кишечнополостные актинии, являются богатейшим источником биологически активных соединений полипептидной природы, выполняющих алломоналную и экологическую роль в морских биоценозах. К настоящему времени из них выделено более четырех десятков соединений, которые принадлежат к различным функциональным группам белков и полипептидов и взаимодействуют с высокой селективностью с различными мишенями, в том числе с болевыми рецепторами [Diochot S., Baron A., Rash L.D., Deval E., Escoubas P., Scarzello S., Salinas M., Lazdunski M. A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons // The EMBO Journal 2004, V.23, P.1516-1525; Shiomu K. Novel peptide toxins recently isolated from sea anemones, Toxicon (2009), doi: 10.1016 / j.toxicon. 2009.02.031].

Заявителем совместно с Институтом биоорганической химии РАН им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова впервые был выделен из актинии *Heteractis crispa* полипептид APHC1, имеющий структуру ингибитора протеиназ семейства ВРТИ/Кунитц-типа и обладающий значительной анальгетической активностью *in vivo* [Andreev Y.A., Kozlov S.A., Koshelev S.G., Ivanova E.A., Monastyrnaya M.M., Kozlovskaya E.P., Grishin E.V. Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1) // J. Biol. Chem. 2008, V.283, P.23914-23921]. Авторами было показано, что анальгетический эффект полипептида APHC1, а также полученной на его основе рекомбинантной формы полипептида связан с модулированием (частичным блокированием) болевого ваниллоидного рецептора TRPV1, одного из важнейших интеграторов болевых и воспалительных стимулов и одну из перспективных терапевтических мишеней в лечении болевых состояний.

Аминокислотная последовательность полипептида из актинии *Heteractis crispa* и получение его рекомбинантной формы были запатентованы, поскольку он является первым полипептидом направленного действия на болевой рецептор TRPV1, перспективным для использования в медицине [RU 2368621 C1, 27.09.2009].

Способ выделения ингибитора болевого рецептора TRPV1 включает следующие стадии: экстракцию полипептидов 70%-ным водным этанолом; гидрофобную хроматографию полипептидов на полихrome-1 в ступенчатом градиенте этанола от 10 до 70%; катионообменную хроматографию на Bio-Rex 70 в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,5 М (в 5 мМ аммоний-ацетатном буферном растворе, рН 4,5); катионообменную хроматографию на SP-Sephadex C-25 в линейном градиенте рН от 4,5 до 7,3 (в 5 мМ аммоний-ацетатном буферном растворе) и градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,2 М; а также обращенно-фазовую ВЭЖХ активной фракции полипептидов на колонке Jupiter C₅ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила от 5 до 60% в присутствии 0,1% ТФУ.

Длительность этого способа составляет 158 ч, выход целевого продукта - 0,025% от суммарного белка в экстракте.

К недостаткам способа-прототипа относятся его длительность, трудоемкость и низкий выход целевого продукта.

Задачей изобретения является усовершенствование известного способа получения полипептида актинии *Heteractis crispa*, обладающего анальгетическим действием.

Поставленная задача решена тем, что в известном способе получения полипептида из актинии *Heteractis crispa*, обладающего анальгетическим действием, включающем

гомогенизацию актинии, экстракцию активной фракции полипептидов 70% водным этанолом и последующую хроматографическую очистку целевого продукта, согласно изобретению очистку активной фракции осуществляют на полихrome-1 в статическом варианте элюцией балластных белков 15%-ным водным этанолом; фракции полипептидов, проявляющих анальгетический эффект на тепловой модели, элюируют 20%-ным этанолом. Затем полученную фракцию полипептидов очищают хроматографией на Cellulose CM-32 в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,5 М в 0,01 М аммоний-ацетатном буферном растворе (pH 6.0). Далее фракцию, проявляющую выраженный анальгетический эффект на тепловой модели, подвергают ВЭЖХ на обращенной фазе Nucleosil C₁₈, уравновешенной 5%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ном водном растворе трифторуксусной кислоты (pH 2.2), элюируя конечный активный полипептид-анальгетик в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (5-60%) в 0,1%-ном водном растворе трифторуксусной кислоты.

Технический результат, обеспечиваемый изобретением, заключается в увеличении выхода целевого продукта, в упрощении способа его выделения, что снижает трудозатраты на его очистку и тем самым снижает себестоимость целевого продукта.

Низкая эффективность выделения анальгетического полипептида по способу-прототипу обусловлена использованием гидрофобной хроматографии в колоночном варианте и ионообменной хроматографии на смолах Bio-Rex 70 и SP-Sephadex C25. Высокая обменная емкость этих смол (3,3 мэКв/мл у Bio-Rex 70 и 2,3±0,3 мэКв/мл у SP-Sephadex C25) обуславливает многоточечное связывание с ними элюируемых белков и, как следствие, их неудовлетворительное разрешение. Низкий выход целевого продукта связан, по-видимому, также со значительными гидрофобными взаимодействиями и образованием водородных связей аминокислотных остатков элюируемых белков с материалом матриц, что приводило к заметной сорбции белков актинии носителями Bio-Rex 70 и SP-Sephadex C25.

Использование в заявляемом способе Cellulose CM-32 в предлагаемых условиях выделения позволило устранить вышеперечисленные недостатки, как следует из сравнительных данных, приведенных в таблице. Преимущество предлагаемого приема выделения не является очевидным, т.к. невозможно заранее предсказать поведение белков при хроматографировании на этом носителе ввиду многокомпонентности экстракта актинии, содержащего помимо полипептида-анальгетика массу балластных белков.

Так, например, ранее сочетание смол Bio-Rex 70 и SP-Sephadex C25 было успешно использовано заявителем для выделения нескольких нейротоксинов из актинии *Radianthus macrodactylus* (в настоящее время этот вид актинии называется *Heteractis crispa*), причем после хроматографии на SP-Sephadex C25 белковые фракции, содержавшие нейротоксины, элюировались с очень хорошим разрешением и, практически, в индивидуальном состоянии [Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. Аминокислотная последовательность нейротоксина III из актинии *Radianthus macrodactylus* // Биоорган, химия 1985. Т.11, С.302-310]. В то же время применение Bio-Rex 70 и SP-Sephadex C25 для ионообменной хроматографии белковых фракций в способе-прототипе оказалось менее эффективным (фиг.1, стадии 2 и 3).

Применение гидрофобной хроматографии в статическом варианте (на воронке Шотта), предложенное в заявляемом способе, значительно уменьшило как время элюции белков (фиг.2, 1 стадия), так и их возможную денатурацию, связанную с гидрофобными взаимодействиями белковых глобул с материалом матрицы.

Предлагаемый способ осуществляют следующим образом.

Актинии *Heteractis crispa* гомогенизируют и экстрагируют активную фракцию полипептидов 70%-ным этанолом в течение 12 часов при 4°C, затем супернатант отделяют центрифугированием, после чего этанол упаривают. Полученный прозрачный раствор (20 мг/мл белка по Лоури) наносят на фильтровальную воронку Шотта с полихромом-1 (14×8 см), уравновешенным дистиллированной водой. Элюцию балластных белков и полипептидов осуществляют 15%-ным этанолом, фракцию полипептидов, проявляющих анальгетический эффект на тепловой модели, элюируют 20%-ным этанолом. Полученную фракцию полипептидов хроматографируют на колонке с ионообменной смолой Cellulose CM-32. Элюцию полипептидов, проявляющих анальгетический эффект на тепловой модели, осуществляют в линейной градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,5 М в рабочем буферном растворе. Фракции, проявляющие анальгетический эффект на тепловой модели, объединяют и используют для дальнейшей очистки с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Данные по выходу и времени хроматографии на каждой стадии выделения полипептидных фракций представлены в таблице.

Схема выделения полипептида из актинии <i>Heteractis crispa</i> , обладающего анальгетическим действием					
Способ-прототип			Предлагаемый способ		
Стадия выделения // время выделения	Кол-во белка, мг	Выход, %	Стадия выделения // время выделения	Кол-во белка, мг	Выход, %
Суммарный экстракт	20000	100	Суммарный экстракт	20000	100
Гидрофобная хроматография на полихромом-1 (колоночный вариант) 20%-ная фр. // 23 ч	10000	50	Гидрофобная хроматография на полихромом-1 (статический вариант): 20%-ная фр. / 2 ч	10000	50
Ионообменная хроматография на Bio-Rex 70: 1 фр. // 102 ч	2000	10	Ионообменная хроматография на Cellulose CM-32 полипептидов 20%-ной фр.: 5 фр. // 28 ч	1400	7
Ионообменная хроматография фракции 1 на SP-Sephadex G-25: 3 фр. // 32 ч	50	0,25			
Обращенно-фазовая ВЭЖХ 3 фр. на Jupiter C ₅ : 1 фр. // 1 ч	5	0,025	Обращенно-фазовая ВЭЖХ 5 фр. на Nucleosil C ₁₈ : 1 фр. / 1 ч	60	0,3

Из представленной таблицы видно, что длительность заявляемого способа составляет 31 ч - это в 5 раз меньше длительности способа-прототипа (158 ч). Выход целевого продукта - 0,3% от суммарного белка в экстракте, что в 12 раз превышает его выход по способу прототипу (0,025%).

На фиг.1 представлены стадии выделения анальгетического полипептида из *Heteractis crispa* по способу-прототипу.

На фиг.2 представлены стадии выделения анальгетического полипептида из *Heteractis crispa* по заявляемому способу.

Стрелками показаны объединенные фракции полипептидов, проявляющих анальгетический эффект на модели тепловой стимуляции боли. Скорость элюции

полипептидов на колонке с полихромом-1 - 1,2 л/ч, на воронке Шотта с полихромом-1 - 5 л/ч; на Bio-Rex 70 - 22 мл/ч мин; на SP-Sephadex C-25 - 70 мл/ч; на Cellulose CM-32 - 24 мл/ч.

Изобретение иллюстрируется примером конкретного выполнения.

5 Пример. 5 кг актинии *Heteractis crisp*, свежевывловленной или хранящейся в замороженном состоянии, измельчают и экстрагируют активную фракцию полипептидов 70%-ным этанолом в течение 12 часов при 4°C при соотношении ткань: этанол 1:3, затем супернатант отделяют центрифугированием при 3000×g в течение 0,5
10 ч, после чего этанол упаривают. Полученный прозрачный раствор (1 л, 20 мг/мл белка по Лоури) наносят на воронку Шотта с полихромом-1 (14×8 см), уравновешенным дистиллированной водой. Элюцию балластных белков и полипептидов осуществляют 15%-ным этанолом (6 л). Затем фракцию активных полипептидов элюируют 20%-ным этанолом (1,5 л) со скоростью элюции 500 мл/5 мин. После
15 упаривания и концентрирования на полихроме-1 полипептиды хроматографируют на колонке (2,5×50 см) с Cellulose CM-32 (Whatman, Англия), уравновешенной 0,01 М аммоний-ацетатным буферным раствором, pH 5,14. Элюцию полипептидов осуществляют в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,5 М в рабочем
20 буферном растворе по 1 л каждого. Фракции, проявляющие выраженный анальгетический эффект на тепловой модели, объединяют и используют для обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈, уравновешенной 5%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ном водном растворе ТФУ. Элюцию проводят линейным градиентом концентрации ацетонитрила (5-60%) в 0,1%-ном водном растворе ТФУ.
25 Целевой продукт элюируется с колонки 40% ацетонитрилом с выходом 0,3% от суммарного белка в экстракте актинии.

30 Препарат полипептида, полученный предлагаемым способом, является индивидуальным соединением. Его гомогенность доказана методами SDS-электрофореза в 15%-ном ПААГ (полиакриламидном геле) и МАЛДИ-ТОФ-МС (матричной лазерной десорбционно-ионизационной времяпролетной масс-спектрометрией).

Для подтверждения идентичности полученного полипептида-анальгетика
35 анальгетику-прототипу определена его аминокислотная последовательность методом деградации по Эдману на автоматическом секвенаторе Procise 492 (Applied Biosystems, США). Предварительно дисульфидные связи были восстановлены дитиотреитолом, после чего полипептид был актилирован 4-винилпиридином для защиты
40 образовавшихся сульфгидрильных групп. Модифицированный полипептид (фракция, соответствующая восстановлению всех дисульфидных связей) был выделен из реакционной смеси с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ и затем подвергнут трипсинолизу (гидролиз пептидных связей по остаткам лизина и аргинина).

45 В результате разделения продуктов гидролиза с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ было выделено 7 триптических пептидов, секвенирование которых позволило установить их последовательность (GSICLEPK, VVGPCTAYFR, VVGPCTAYFRR, FYFDSETGK, CTVFIYGGCEGNGNFFETLR, ACR, AICRA). Сравнение последовательностей полученных триптических пептидов с аминокислотной
50 последовательностью анальгетика-прототипа показало полную идентичность полипептидов:

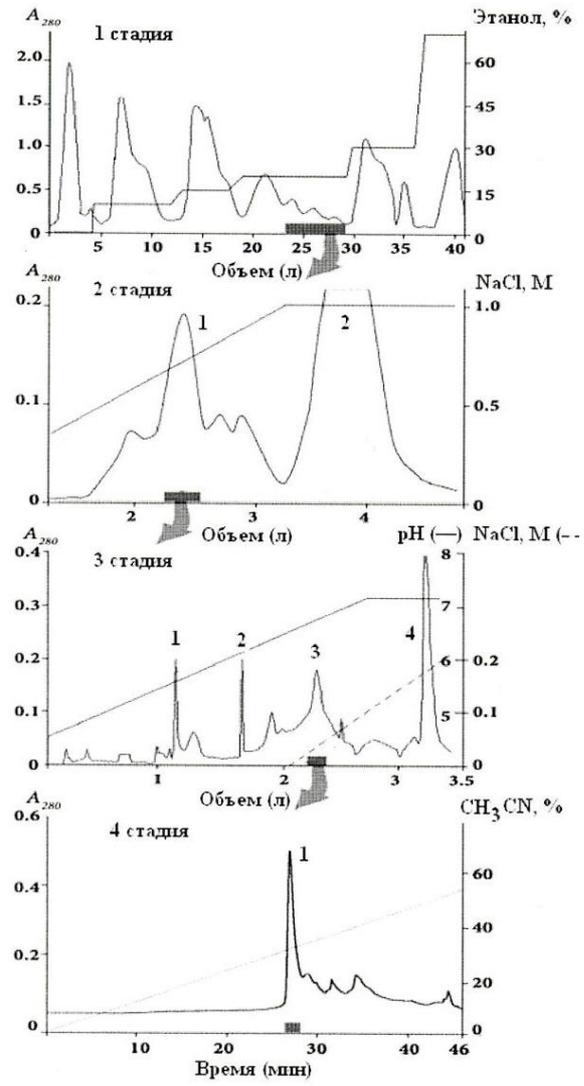
GSICLEPKVVGPCTAYFRRFYFDSETGKCTVFIYGGCEGNGNFFETLRACRAICRA
Молекула ингибитора состоит из 56 аминокислотных остатков, его точная

молекулярная масса равна 6187 Да, что хорошо согласуется с данными масс-спектрометрического анализа.

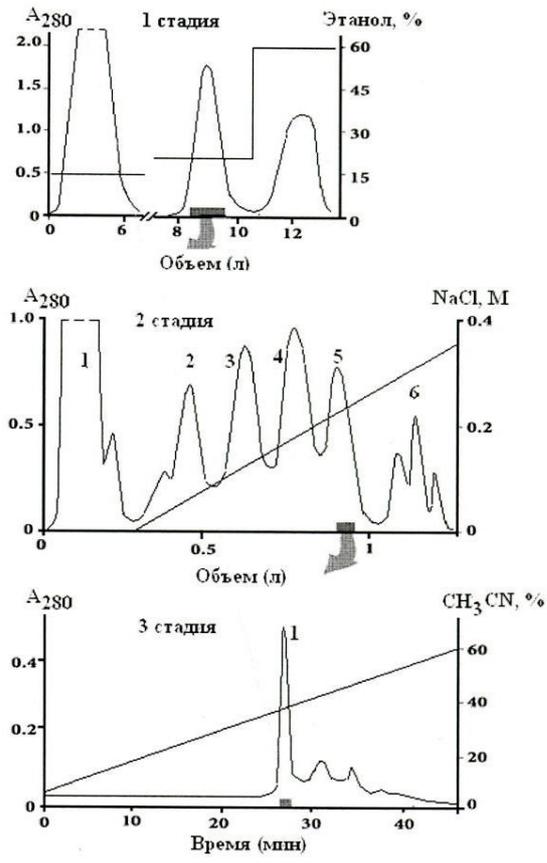
Анальгетический эффект, проявляемый белковыми фракциями на стадиях гидрофобной и ионообменной хроматографии, а также конечного продукта, определяют на экспериментальных животных (мышьях) в биологическом тесте теплового стимулирования боли по отдергиванию лапки (измеряют увеличение времени, прошедшего с момента погружения лапки в горячую воду (50°C) до момента ее отдергивания).

Формула изобретения

Способ получения полипептида из актинии *Heteractis crispa*, обладающего анальгетическим действием, включающий гомогенизацию актинии, экстракцию активной фракции полипептидов 70%-ным водным этанолом и последующую хроматографическую очистку целевого продукта, отличающийся тем, что очистку активной фракции осуществляют на полихром-1 в статическом варианте элюцией балластных белков 15%-ным водным этанолом, фракции полипептидов, проявляющих анальгетический эффект на модели тепловой стимуляции боли, элюируют 20%-ным этанолом, затем полученную фракцию полипептидов очищают хроматографией на Cellulose CM-32 в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,5 М в 0,01 М аммоний-ацетатном буферном растворе pH 6,0, далее фракцию, проявляющую выраженный анальгетический эффект на модели тепловой стимуляции боли, подвергают ВЭЖХ на обращенной фазе Nucleosil C₁₈, уравновешенной 5%-ным ацетонитрилом в 0,1%-ном водном растворе трифторуксусной кислоты pH 2,2, элюируя конечный активный полипептид-анальгетик в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 5-60% в 0,1%-ном водном растворе трифторуксусной кислоты.



Фиг. 1



Фиг. 2