

Д. А. Гусаров, И. В. Соколова, В. Д. Гусарова, Е. А. Евтеева,
Т. В. Воробьева, С. А. Косарев, Е. Д. Шибанова, Д. И. Баирамашвили

РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОЙ ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ N,N-БИСМЕТИОНИЛГИСТОНА Н1.3, ИСПОЛЪЗУЕМОГО ДЛЯ ТЕРАПИИ ЛИМФОМ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

В настоящее время в медицине все большее внимание уделяется терапевтическому лечению лимфом с помощью моноклональных антител. Однако отсутствие в нашей стране производства подобных препаратов вынуждает закупать их за рубежом. Показано, что гистоны класса Н1 могут быть использованы как конкурентные аналоги моноклональных антител по результатам терапевтического воздействия. Нами разработана эффективная отечественная опытно-промышленная технология получения рекомбинантного N,N-бисметионилгистона Н1.3, описанная в настоящей статье. Нарботанное количество препарата, чистота и активность которого подтверждены различными тестами, позволило начать клинические испытания в нашей стране.

Ключевые слова: N,N-бисметионилгистон, лимфома, хроматография, технология.

Одним из наиболее опасных онкологических заболеваний являются лимфомы, в процессе которых происходит неконтролируемое накопление опухолевых лимфоцитов. По классификации ВОЗ выделяют 43 различные формы лимфом [1]. В наиболее общем рассмотрении все эти формы входят либо в классические ходжкинские (лимфогранулематоз ходжкинского типа), либо в неходжкинские лимфомы.

Лечение таких образований может включать гормональную, радио-, химио- и комбинационную терапии, гематопозную пересадку стволовых клеток, а также терапию моноклональными антителами. Последней в настоящее время уделяют особенное внимание. При терапии моноклональными антителами, наиболее известным из которых является ритуксимаб (мабтера), мишенью в организме больного является специфическая поверхностная детерминанта CD20, представляющая собой гликозилированный фосфорилированный белок, состоящий из 297 а.к.о. (молекулярная масса 32 – 37 кДа) [2, 3]. Однако такое терапевтическое лечение имеет ряд недостатков: возможные анафилактические реакции [4]; осложнения, вызываемые радиоактивными изотопами (чаще всего йода 131 или иттрия 90), которыми мечено моноклональное антитело (например, ибритумомаб, или зевалин, а также тоситумомаб, или бексар).

Поэтому нам представляется более перспективным использование препаратов на основе линкерных гистонов для терапии лимфом. Гистоны класса Н1 и их производные могут образовывать агрегаты с фосфатидилсеринем мембраны опухолевой клетки, «вымывая» его из бислоя фосфолипидов, что приводит к апоптозу уже в считанные минуты действия гистона и к некрозу опухоли через несколько часов терапии [5]. Однако на современном биофармацевтическом рынке в настоящее время присутствуют только препараты на основе

моноклональных антител, причем в нашей стране, не имеющей собственных производств, необходимо закупать их за счет государственного бюджета [6]. Представляется перспективным разработать эффективную отечественную технологию производства лекарственных форм на основе гистонов, как конкурентных заместителей моноклональных антител. Одним из таких гистонов является N,N-бисметионилгистон Н1.3 [7]. Цель настоящей работы — разработка опытно-промышленной технологии производства активной фармацевтической субстанции (АФС) рекомбинантного N,N-бисметионилгистона Н1.3, на основе уже разработанной лабораторной технологии [8].

Экспериментальная часть

Приборы и материалы

В качестве системы для синтеза рекомбинантного N,N-бисметионилгистона Н1.3 использовался штамм-продуцент *E. coli* BL21/prhN1.3, полученный от ЗАО “Крионикс” (Россия).

В экспериментах по биосинтетической наработке белка использовались следующие реактивы квалификации ч., ч.д.а., х.ч: глюкоза; аминотон; дрожжевой экстракт; калий фосфорнокислый двузамещенный; натрий хлористый; магний сернокислый; канамицин; аммиак; изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ); вода очищенная. Использовалось следующее оборудование: емкостной танк вместимостью 2,5 м³; ферментер вместимостью 3 м³; сепаратор Westfallia (GEA Westfallia, Германия); проточный дезинтегратор Gaulin MC 211 (APV, Германия).

В экспериментах по выделению и очистке использованы следующие реактивы квалификации х.ч. и фармакопейной чистоты: хлорная, лимонная кислоты; этанол; хлорид натрия; гидроксид натрия; вода для инъ-

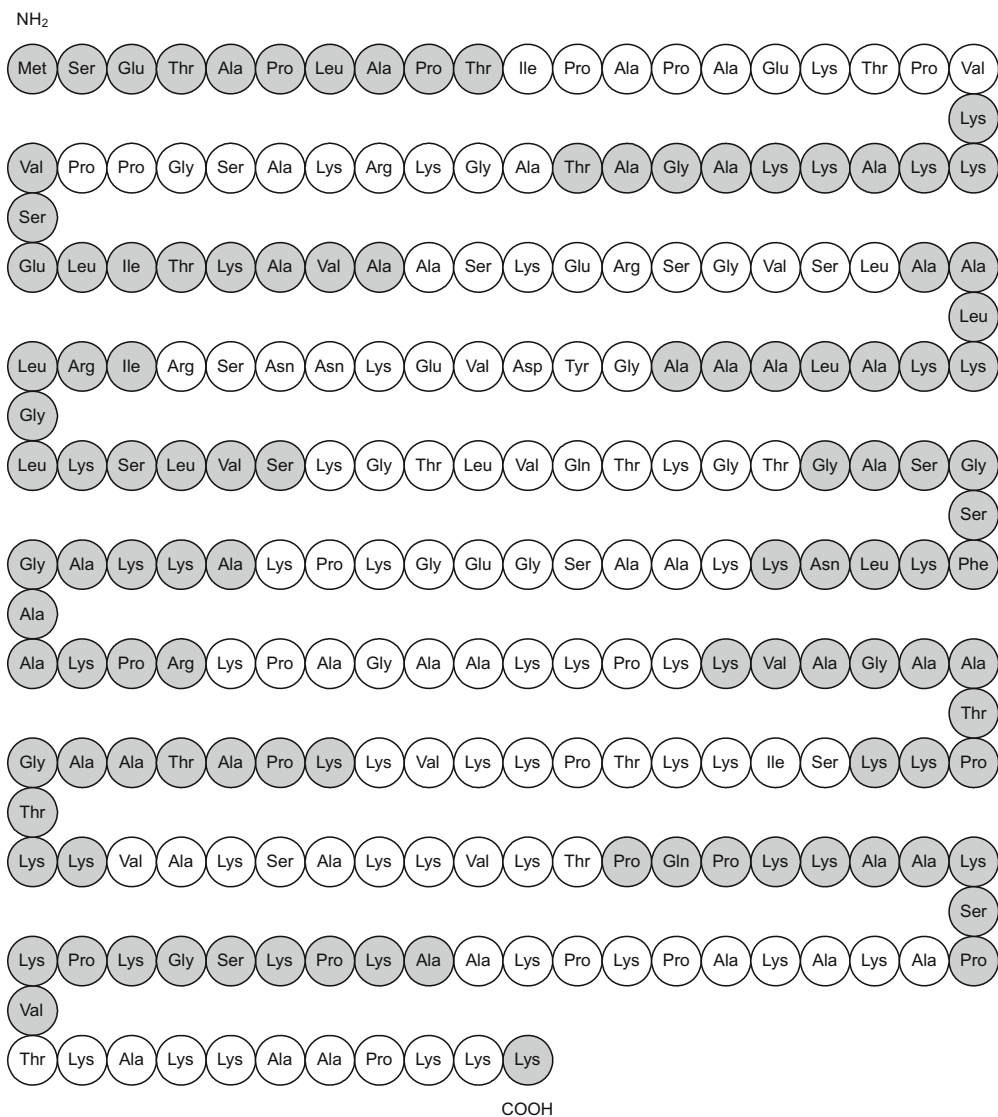


Рис. 1. Аминокислотная последовательность человеческого гистона H1.3.

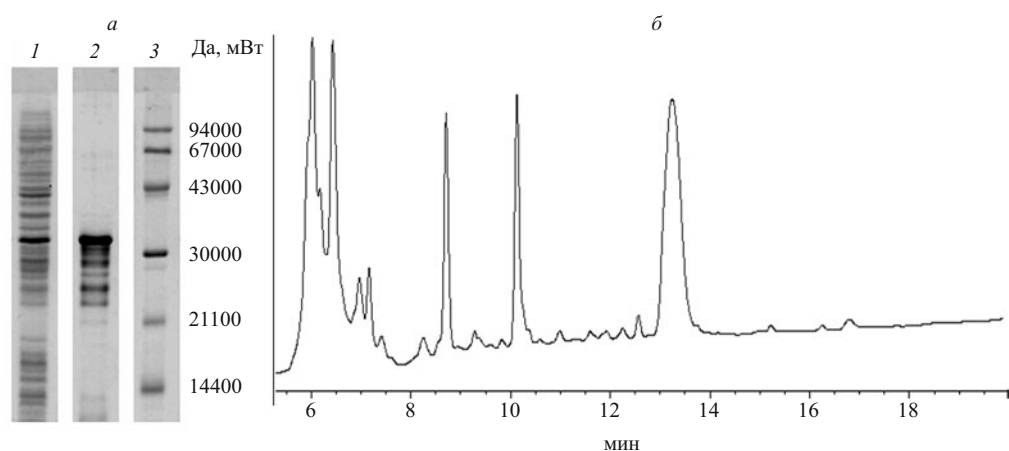


Рис. 2. Результаты аналитического контроля стадии экстракции целевого белка из суспензии дезинтеграта клеточной массы: *a* — ПААГЭ, дорожка 1 соответствует белку до экстракции, дорожка 2 — белку после экстракции, дорожка 3 — стандартам масс LMW; *б* — обращено-фазовая ВЭЖХ, время удержания целевого белка составляет примерно 13,4 мин.

екций (очищенная на дистилляционной установке ДЭ-25, модель 784, Россия). Растворы всех подвиж-

ных фаз фильтровали через фильтр 0,22 мкм, растворы N,N-бисметионилгистона — через фильтр 1,2 мкм.

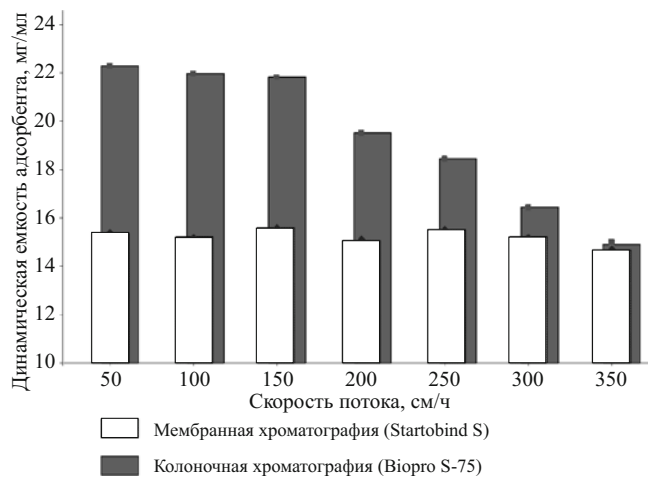


Рис. 3. Сравнение динамической емкости катионообменных мембраны и сорбента при различных линейных скоростях потока.

Использовалось следующее оборудование: хроматографическая система BioProcess 6 mm (GE Healthcare, Швеция), снабженная хроматографической колонной диаметром 300 мм (GE Healthcare, Швеция), упакованной сорбентом Macroprep S (Biorad, США); ВЭЖХ система, состоящая из градиентного насоса K-1800 (Knauer, Германия), УФ-детектора Smartline 2500 (Knauer, Германия), самописца R-18 (GE Healthcare, Швеция) и колонны динамического аксиального сжатия диаметром 100 мм (Биохиммак, Россия), упакованной сорбентом Kromasil KR-300-C4-16 (Akzo Nobel Eka Chemicals Separation AB, Швеция); хроматографическая система, состоящая из изократического насоса MCP (Ismatec, Швейцария), УФ-детектора Smartline 2500 (Knauer, Германия), самописца R-18 (GE Healthcare, Швеция) и хроматографической колонны диаметром 200 мм (GE Healthcare, Швеция), упакованной сорбентом Sephacryl S-100 (GE Healthcare, Швеция).

В опытах по сравнительному изучению мембранной и колоночной хроматографии были использованы мембрана Sartobind S mini (Сарторос, Россия) и колонка BioPro S-75 (УМС, Германия); внутренний объем обеих тест-систем примерно одинаков и равен 7 мл.

Методы анализа

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГЭ) проводили согласно методу Laemmli [9]. Окрашивание проводили при помощи Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA).

Чистоту и концентрацию гистона в растворах анализировали методом ОФ ВЭЖХ на хроматографической системе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США), снабженной хроматографической колонкой УМС Butyl 5 мкм 30 нм, 150 × 2,1 мм (УМС Со, Германия), УФ-детектором (длина волны 214 нм) и системой дозированного ввода пробы (объем пробы 20 мкл). Подвижная фаза состояла из ацетонитрила, воды для инъекций, 20 мМ фосфата натрия, 0,1 % ортофосфорной кислоты (рН 2,5–3,0). Элюирование проводили в режиме градиента концентрации ацето-

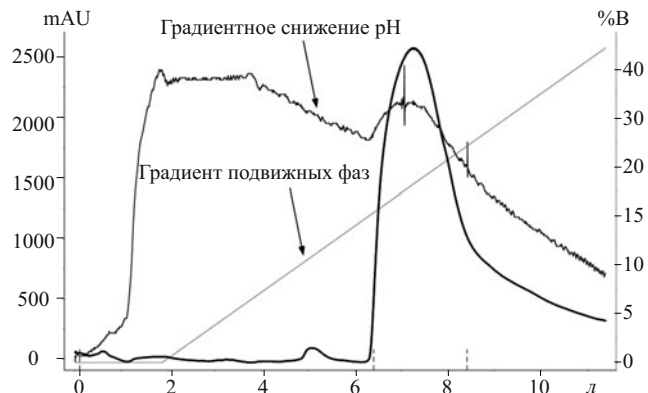


Рис. 4. Хроматограмма процесса обращено-фазовой ВЭЖХ очистки N,N-бисметионилгистона. Левая ось ординат — оптическая плотность; правая ось — процентное содержание подвижной фазы “В”.

нитрила (от 0 до 60 об. %). Скорость потока 1,0 мл/мин. Время анализа 20 мин.

Содержание мономерной формы гистона, а также продуктов его деградации определяли методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ). Анализ осуществлялся на хроматографической системе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США), снабженной хроматографической колонкой УМС SEC-DIOL 5 мкм 20 нм, 300 × 8 мм (УМС Со, Германия), УФ-детектором (длина волны 214 нм) и системой дозированного ввода пробы (объем пробы 2 мкл). Подвижная фаза состояла из 5 мМ ацетата натрия, 5 мМ уксусной кислоты, 250 мМ хлорида натрия в воде для инъекций, рН 4,8. Скорость потока 1 мл/мин. Время анализа 15 мин.

Содержание бактериальных эндотоксинов определяли с помощью геле-тромб ЛАЛ-теста, как описано в работе [10], чувствительность ЛАЛ-реактива (производитель Cape Cod, Inc., США) 0,03 ЭЕ/мг. В качестве положительного контроля использовали контрольный стандарт эндотоксина O113:H10 (Cape Cod, Inc., США).

Содержание остаточных белков клеток продуцента определяли с помощью ИФА (иммунно-ферментного анализа), как описано в инструкции, прилагаемой к набору ELISA *E.coli* Host Cell Proteins (Cygnus Technologies Inc., США).

Промышленное культивирование продуцента и биосинтез белка

Культивирование клеток штамм-продуцента проводили в несколько этапов. На первом этапе выращивали посевной материал в колбах, как описано ранее [8]. На втором этапе для выращивания продуцента в ферментере готовили и стерилизовали питательную среду, содержащую аминотон, дрожжевой экстракт, фосфорнокислый двузамещенный калий, хлористый натрий и сернокислый магний. Затем в питательную среду добавляли стерильные глюкозу и канамицин. После этого осуществляли засев ферментера посевным материалом (0,2 % об.) и выращивали клетки продуцента при температуре 37 °С до достижения в культуральной

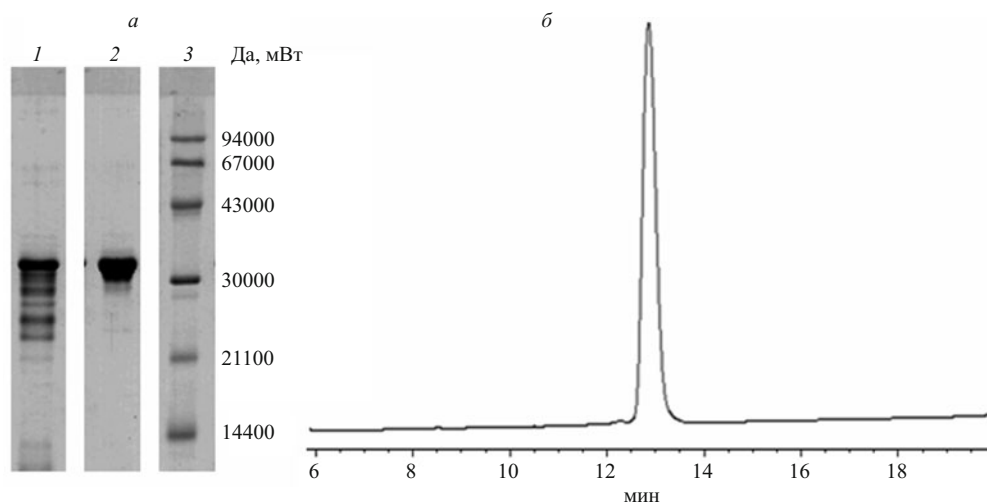


Рис. 5. Результаты аналитического контроля стадии обращено-фазовой ВЭЖХ: *a* — ПААГЭ, дорожка 1 соответствует белку до очистки, дорожка 2 — белку после очистки, дорожка 3 — стандартам масс LMW; *б* — обращено-фазовая ВЭЖХ, время удержания целевого белка составляет примерно 13,4 мин.

жидкости оптической плотности, равной 10 оптическим единицам. На следующем этапе проводили индукцию синтеза рекомбинантного белка путем введения в ферментер водного стерильного раствора ИПТГ. Через 2,0 – 2,5 ч после введения индуктора процесс биосинтеза белка останавливали, а культуру клеток подавали на сепаратор для отделения клеток от культуральной жидкости. Полученную суспензию клеток разрушали с помощью проточного дезинтегратора.

Промышленное выделение белка

Целевой белок выделяли из дезинтеграта клеточной массы с помощью экстракции 1,0 – 2,5 % хлорной кислотой. Для этого медленно (в течение 10 – 15 мин) при активном перемешивании добавляли концентрированную хлорную кислоту в суспензию дезинтеграта до установления pH менее 2,0. При этом рекомбинантный N,N-бисметилонилгистон Н1.3 оказывался в надосадочной жидкости, которую отделяли от коагулированных примесей на сепараторе.

Промышленная очистка белка

Белок, выделенный с помощью экстракции хлорной кислотой, очищали в 3 последовательных хроматографических этапа. На первом этапе белок концентрировали, одновременно избавляя от примесей, сильно отличных от целевого по физико-химическим свойствам, с помощью катионообменной хроматографии на

сорбенте Маскорпер S. Полученные целевые фракции очищали с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ на сорбенте Kromasil C4. На этом этапе достигали фармакопейной чистоты белка, максимально удаляя все примеси, включающие родственные белки, остаточные белки штамм-производителя, ДНК, бактериальные эндотоксины и т.д. Далее предварительно осажденную этиловым спиртом целевую фракцию белка избавляли от компонентов подвижной фазы после ВЭЖХ с помощью гель-фильтрации, элюируя водой для инъекций. Очищенную белковую фракцию после гель-фильтрации замораживали и лиофилизовали для получения АФС.

Результаты и их обсуждение

Промышленное культивирование продуцента и биосинтез белка

Гистоны — основной класс нуклеопротеинов, ядерных белков, необходимых для сборки и упаковки нитей ДНК в хромосомы. Данные белки играют важную роль в поддержании и изменении структуры хромосом на разных стадиях клеточного цикла, а также в регуляции активности генов [11].

Гистон Н1.3 представляет собой белок с молекулярной массой около 22,5 кДа (221 а.к.о.) [12]. Как видно из представленной аминокислотной последовательно-

Аналитический контроль субстанции N,N-бисметилонилгистона Н1.3

Показатель	Метод анализа	Результат	Требование	Соответствие
Чистота, %	ВЭЖХ	99,6	Не менее 98	Соответствует
Чистота, %	ВЭЖХ	98,1	Не менее 97	Соответствует
Высокомолекулярные примеси, %	ПААГЭ	0	Не более 2	Соответствует
Низкомолекулярные примеси, %	ПААГЭ	< 1	Не более 2	Соответствует
Бактериальные эндотоксины, ЭЕ/мг	ЛАЛ-тест	< 0,125	Не более 0,5	Соответствует
Белки клеток <i>E. coli</i> , нг/мг	ИФА	0,15	Не более 100	Соответствует
Остаточная ДНК, пг/мг	ПЦР	2,5	Не более 5	Соответствует
Активность, мкМ	Клеточный тест	2,5	IC ₅₀ : 0,5 – 3,5	Соответствует

сти (рис. 1), он очень богат остатками лизина (61 а.к.о.), которые придают ему ярко выраженный положительный заряд (pI 11,02). Производное гистона H1.3, имеющее на N-конце дополнительный остаток метионина и названное разработчиком “N,N-бисметионилгистон H1.3”, было предложено использовать для создания препарата “Oncohist” для терапии лимфом [7].

Для биосинтеза рекомбинантных белков часто используются штаммы-продуценты *Escherichia coli* по многим причинам, а именно: культивировать прокариотические микроорганизмы дешевле по сравнению с эукариотическими клетками, бактерии способны быстро синтезировать белки в больших количествах, и, наконец, накоплен значительный опыт работы именно с *E. coli*.

В ходе промышленного культивирования штамм-продуцента и биосинтеза получали N,N-бисметионилгистон H1.3, содержание которого в дезинтеграте, определенное методом ПААГЭ, составляло всего 10 %, что соответствовало выходу 160 – 180 г целевого белка/м³ культуральной жидкости. Оптимизация условий ферментации не привела к заметному увеличению выхода. Однако некоторое улучшение можно было статистически проследить при снижении температуры процесса до введения индуктора ИТПГ, что связано с увеличением роста клеток. Тем не менее рост клеток не пропорционально отражался на увеличении выхода, из чего можно заключить, что в *E. coli* после начала индукции в большей степени биосинтезировались примесные белки.

Дальнейшее выделение белка из суспензии дезинтеграта с помощью экстракции хлорной кислотой проходило с достаточно высоким выходом (не менее 90 %) и приводило к получению раствора белка с концентрацией около 2,5 мг/мл, загрязненного примесями различной природы. На рис. 2 представлены результаты аналитического контроля экстракции с помощью ПААГЭ и ВЭЖХ. Необходимо отметить, что электрофоретическая подвижность производного гистона (рис. 2, а) соответствует подвижности белка с молекулярной массой 32,5 кДа (было подтверждено методом внутреннего стандарта). Это, по-видимому, связано с сильным положительным зарядом молекулы, снижающим электрофоретическую подвижность. Как видно из рисунка, в ходе экстракции была удалена большая часть балластных белков *E. coli* с молекулярной массой выше 35 кДа, а также значительная часть белков с массой менее 21 кДа.

По данным ВЭЖХ анализа содержание основного вещества после экстракции составляло 33 – 46 % (рис. 2, б).

Для дальнейшей очистки белок необходимо сконцентрировать. Методы концентрирования с помощью солевого осаждения, как ни странно, не оказались эффективными. Даже при использовании сульфата аммония в концентрации насыщения, как описано в [13], не удавалось осадить весь N,N-бисметионилгистон из

раствора, значительная часть белка оставалась в надосадочной жидкости.

Для концентрирования белка ранее нами было предложено использовать катионообменную хроматографию [14]. Ярко выраженный заряд на белке, создаваемый остатками лизина, обеспечивает отличное связывание с катионообменным сорбентом. Однако на производственном уровне разделений белковых молекул все большее внимание уделяется мембранной хроматографии [15]. Она обладает такими преимуществами перед классической колоночной хроматографией, как большая производительность, обеспечиваемая за счет высоких скоростей элюирования; простота валидации; отсутствие трудозатрат на упаковку колонны. Тем не менее известной проблемой ионообменных мембран остается относительно низкая емкость связывания белков.

Нами было проведено сравнительное изучение мембранной и классической колоночной хроматографий применительно к предварительной очистке N,N-бисметионилгистона. Для этого мы использовали отрицательно заряженную сульфопропильную сверхпористую мембрану Sartobind S и колонку, упакованную полиметакрилатным сорбентом с привитой сульфопропильной группой, Biopro S-75. Каждая из этих систем хорошо зарекомендовала себя на рынке товаров для биотехнологии и биофармацевтики и выпускается как для аналитических, так и для производственных нужд; кроме того, сорбент Biopro S-75 уже был нами изучен ранее [14], и результаты работы с ним оказались положительными. На каждую из тест-систем, предварительно уравновешенную подвижной фазой, содержащую 10 мМ лимонной кислоты (рН 3,0), наносили раствор экстрагированного белка, рН в котором также был доведен до 3,0 с помощью 10 М NaOH. Нанесение заканчивали, когда целевой белок начинал элюироваться без сорбции, т.е. когда все активные центры тест-системы были заняты молекулами белка. Было обнаружено, что динамическая емкость колонки, упакованной катионитом, составила 18,5 мг белка/мл адсорбента. В то же время емкость мембраны оказалась несколько ниже, 15,5 мг/мл. Ранее уже было показано, что скорость элюирования может достаточно сильно влиять на динамическую емкость адсорбента, особенно в случае колоночной хроматографии [15]. Поэтому нами были проведены аналогичные опыты по определению динамической емкости, но при различных скоростях нанесения. Действительно, как видно из рис. 3, динамическая емкость Biopro S-75 практически неизменна при скоростях ниже 200 см/ч, а при дальнейшем увеличении скорости нанесения образца динамическая емкость начинала снижаться. С другой стороны, при использовании мембран не было замечено явной зависимости динамической емкости от скорости потока. Стоит также отметить, что при скоростях выше 350 см/ч давление в колонке Biopro S-75 превышало установленный передел в 3 бар (именно такое ограничение чаще всего устанавливается на производственных системах), делая невозмож-

ной дальнейшую работу, поэтому опыты при скоростях выше 350 см/ч не проводились. Однако можно ожидать, что при сверхвысоких скоростях динамическая емкость сорбента будет ниже емкости мембраны.

После нанесения образца обе тест-системы промылись подвижной фазой, содержащей 10 мМ лимонной кислоты (рН 3,0) и 2,0 М NaCl с тем, чтобы десорбировать целевой белок с одновременным концентрированием. В обоих случаях белок элюировался с высокими концентрациями (около 20 мг/мл, т.е. фактор концентрирования равен 8) и выходом (82 – 85 %).

Таким образом, мембранная хроматография N,N-бисметионилгистона Н1.3 является достаточно перспективной заменой классической колоночной хроматографии на производственном уровне.

Полученный высококонцентрированный N,N-бисметионилгистон должен быть очищен от ряда примесей, а именно от родственных белков, остаточных белков (HCP, или host-cell proteins) штамм-производителя, высокомолекулярных и низкомолекулярных примесей, бактериальных эндотоксинов, остаточной ДНК *E. coli*. При этом наибольшую трудность для очистки белков представляют примесные бактериальные эндотоксины (БЭ), наличие которых является неизбежным вследствие использования прокариотических систем экспрессии. БЭ — это липополисахаридные фрагменты внешней клеточной стенки всех грамотрицательных бактерий, высоко токсичные для человека. АФС, особенно служащие для создания инъекционных лекарственных форм, должны быть максимально избавлены от подобных примесей. Разрабатываемая нами технология должна была позволять получать максимально очищенный от БЭ N,N-бисметионилгистона Н1.3 (содержание БЭ в АФС не более 0,5 ЭЕ/мг), т.к. производимая АФС используется для создания готовых лекарственных форм для инфузионного введения.

Ранее нами были описаны различные методы очистки белков от БЭ [16]. Среди наиболее распространенных следует указать двухфазную экстракцию липополисахаридов детергентами, ионообменную, обращено-фазовую и аффинную хроматографии, а также хроматографию гидрофобных взаимодействий. Однако только с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ на аналитическом уровне нам удалось достичь максимально низкого содержания БЭ в субстанции N,N-бисметионилгистона [17]. Трудности, возникающие при очистке целевого рекомбинантного белка, по-видимому, связаны с сильным положительным зарядом молекулы, который обеспечивает крайне устойчивое взаимодействие с отрицательно заряженными липополисахаридами. Силикагель, используемый для обращено-фазовой хроматографии, всегда имеет какое-то, хоть и небольшое, количество силанольных групп, которые остались не привитыми ни липофильным углеводородным лигандом, ни агентом энд-кэппинга. Эти группы обладают отрицательным зарядом, и, возможно, константа связывания N,N-бисметионилгистона с ними выше, чем константа связывания белка с эндотоксинами. Этим может объясняться успех при-

менения обращено-фазовой ВЭЖХ для очистки N,N-бисметионилгистона от БЭ, в то время как остальные, достаточно признанные во всем мире методы не позволяют получить требуемой чистоты субстанции.

Все эксперименты мы проводили на колонках, упакованных сорбентом Kromasil KR-C4-300-16. Элюировали в градиенте подвижных фаз от фазы “А” до фазы “В” за 10 колоночных объемов. Фаза “А” содержала 10 мМ лимонную кислоту (рН 4,0) в воде для инъекций и этиловом спирте (20 % об.). Фаза “В”: 10 мМ лимонная кислота (рН 2,0) в воде для инъекций и этиловом спирте (50 % об.). Таким образом, мы применили смешанный градиент: положительный градиент концентрации органического модификатора (этилового спирта) и негативный градиент рН (рис. 4). Это решение позволило минимизировать расход органического модификатора и повысить селективность процесса. Интересно, что пик основного вещества имеет выраженное правое “плечо”. По результатам ПААГЭ и ВЭЖХ в основной фракции содержался N,N-бисметионилгистон Н1.3 с чистотой, близкой к 100 %, а в “хвостовой” фракции (правое “плечо” пика) — компоненты с молекулярными массами ниже 30 кДа (рис. 5). По данным ЛАЛ-теста основная фракция N,N-бисметионилгистона содержала БЭ менее 0,125 ЭЕ/мг.

Линейное масштабирование полученных результатов до производственного уровня было основано на увеличении внутреннего диаметра колонны при неизменной высоте слоя сорбента. При этом линейная скорость элюирования остается неизменной и, в нашем случае, равной 120 см/ч [18]. Таким образом, при переходе от аналитических условий, описанных в [17], до производственных диаметр колонны был увеличен в 10 раз, а объемная скорость — соответственно в 100 раз. При этом производительность процесса составила примерно 2,0 г белка/л сорбента за 1 ч, что позволило за 1 рабочую смену (8 ч) очищать до 32 г вещества на 1 ВЭЖХ колонне объемом 2 л.

Основную фракцию осаждали этиловым спиртом, осадок отделяли центрифугированием (6–8 тыс. об/мин) и растворяли в воде для инъекций до концентрации N,N-бисметионилгистона Н1.3 30 мг/мл. Затем проводили финальную очистку (от остаточных компонентов подвижных фаз после ВЭЖХ и этилового спирта) образца геле-фильтрацией на сорбенте Sephacryl S-100, нанося образец в объеме, не превышающем 10% от объема колонны и элюируя водой для инъекций. Выход основной фракции (с концентрацией N,N-бис-метионилгистона Н1.3 8–10 мг/мл) составил 80–90 %. Затем полученный раствор лиофилизировали до получения АФС с влажностью не более 10 %.

Результаты контроля качества получаемой АФС демонстрируют высокую степень чистоты белка (таблица). С помощью разработанной технологии было наработано количество АФС, достаточное для клинических испытаний, которые были начаты в 2010 г. Подана заявка на патент Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА

1. A. Fritz, C. Percy, A. Jack, et al. (eds.), *International Classification of Diseases for Oncology*, Third Edition, World Health Organization, Geneva (2000).
2. P. Stashenko, L. M. Nadler, R. Hardy, and S. F. Schlossman, *J. Immunol.*, **125**, 1678 – 1685 (1980).
3. J. Ernst, H. Li, H. S. Kim, et al., *Biochemistry*, **44**, 15150 – 15158 (2005).
4. В. М. Моисеенко, *Практич. онкология*, **3**(4), 253 – 261 (2002).
5. M. Zeppezauger, *European Patent*, EP 0973541 (2000).
6. Д. А. Гусаров, *Биофарм. ж.*, **2**(4), 8 – 13 (2010).
7. P. Gross, H. Jornvall, M. Thiry, et al., *Bis-Met Histone*, *World Intellectual Property Organization Patent Application*, WO 2008 / 122434 A1.2008
8. Лабораторный регламент №ЛР 02699487-13-01 (2009).
9. J. King and U. K. Laemmli, *J. Mol. Biol.*, **75**(2), 315 – 324 (1973).
10. Ю. С. Рябко, О. В. Лукин, Е. Н. Шепель и др., *Биофарм. ж.*, **1**(1), 34 – 37 (2009).
11. W. Albig, D. M. Runge, M. Kratzmeier, and D. Doenecke, *FEBS Let.*, **435**, 425 – 450 (1998).
12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/4885377?report=GenPept>.
13. M. Kratzmeier, W. Albig, T. Meergans, and D. Doenecke, *Biochem. J.*, **337**, 319 – 327 (1999).
14. Д. А. Гусаров, В. А. Ласман, С. А. Косарев и др., *Биофарм. ж.*, **2**(1), 42 – 48 (2010).
15. Г. Л. Волков, С. П. Гаврилюк, В. В. Скалка и др., *Биофарм. ж.*, **2**(2), 24 – 31 (2010).
16. Д. А. Гусаров, *Биофарм. ж.*, **1**(3), 10 – 17 (2009).
17. Н. С. Брыкова, Н. А. Брагина, Д. А. Гусаров и Д. И. Баирамашвили, *Биофарм. ж.*, **2**(4), 25 – 31 (2010).
18. Д. А. Гусаров, В. А. Ласман, А. Ф. Миронов и Д. И. Баирамашвили, *Биофарм. ж.*, **1**(3), 30 – 35 (2009).

Поступила 12.08.10

DEVELOPING EFFECTIVE EXPERIMENTAL COMMERCIAL TECHNOLOGY FOR THE PRODUCTION OF N,N-BIS-MET-HISTONE H1.3 USED IN THE TREATMENT OF LYMPHOMAS

D. A. Gusarov, I. V. Sokolova, V. D. Gusarova, E. A. Evteeva, T. V. Vorob'eva, S. A. Kosarev, E. D. Shibanova, and D. I. Bairamashvili

Shemyakin – Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997, Russia

At present, much attention is devoted to the treatment of lymphomas by means of monoclonal antibodies. Unfortunately, no preparations such as Rituximab (Mabthera) are produced in the Russian Federation and these have to be imported from abroad. It is shown that H1 type histones possessing an activity similar to that of Rituximab can be used for such a therapy. We have developed an experimental commercial technology for the production of recombinant N,N-bis-met-histone H1.3. The activity and purity of the obtained preparation were demonstrated in various tests. The accumulated amount of the active pharmaceutical substance is enough to start clinical trials in Russia.

Key words: N,N-bis-Met-histone H1.3, lymphoma, chromatography, technology



ПРЕСС-РЕЛИЗ

02.04.2012

Проектная компания РОСНАНО начинает выпуск радиочастотных меток нового поколения

30 марта 2012 года проектная компания РОСНАНО «РСТ-Инвент» запустила производство RFID-меток (Radio Frequency Identification – радиочастотная идентификация). На первом этапе компания приступила к выпуску меток-наклеек семейства iNano, куда входят BiblioTag, LogTag и DrugTag.

Метка DrugTag оптимизирована для маркировки лекарственных препаратов в стеклянных емкостях. Конструкция антенны обеспечивает уверенную регистрацию метки в дальней и ближней зонах при маркировке сухих лекарственных смесей и надежное чтение метки в ближней зоне (до 30 см) при маркировке жидких растворов.

ОАО «РОСНАНО»

117420, Москва, Проспект 60-летия Октября, 10А Т: +7 495 9885388, Ф: +7 495 9885399

Пресс-служба: Т: +7 495 9885677, Е: press@rusnano.com

www.rusnano.com