



ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

1  
(21) 4022043/28-14  
(22) 21.02.86  
(31) 704341; 704677  
(32) 22.02.85  
(33) US  
(46) 07.02.90. Бюл. № 5  
(71) Монсанто Компани (US)  
(72) Лерри Эндрю Бэнтл, Джеймс Уил-  
лиам Митчелл, Стифен Брайлей Сторс  
и Грант Тсубэши Шимамото (US)  
(53) 612.015(088.8)  
(56) Arch. of Biochem. and Biophys.,  
1970, v.138, p.338-346.

2  
(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ СОМАТОТРОПНОГО  
БЕЛКА ИЗ СВЕТОПРЕЛОМЛЯЮЩИХ ТЕЛ КЛЕ-  
ТОК ХОЗЯИНА

(57) Изобретение относится к медицине  
и может быть использовано для выделе-  
ния соматотропного белка из светопре-  
ломляющих тел клеток хозяина. Цель -  
упрощение способа и повышение качест-  
ва целевого продукта за счет сохране-  
ния его нативных свойств. Для этого  
солюбилизацию белка проводят 4,5-10 М  
раствором мочевины или диметилсульфо-  
на при pH 9-12,1 и 4-25°C, а натура-  
цию осуществляют в водном растворе  
2-5 М мочевины при указанных значени-  
ях pH и температуры, причем вторую  
операцию проводят в присутствии мяг-  
кого окислителя. 4 табл.

Изобретение относится к медицине  
и может быть использовано для выделе-  
ния соматотропного белка из клеток  
E.Coli.

Цель изобретения - упрощение спо-  
соба и повышение качества целевого  
продукта.

На фиг.1 и 2 приведены графики за-  
висимости общего количества солюбили-  
зированного белка от концентрации  
мочевины; на фиг.3 - график выхода  
мономера в зависимости от concentra-  
ции мочевины.

П р и м е р 1. Солюбилизация бычье-  
го N-метионилсоматотропина (MBS), экс-  
прессированного в E.Coli.

Собранные клетки разрывают, пропус-  
кая их два раза через гомогенизатор

типа Manton-Gaulin homo genizer. Ра-  
створ гомогената подвергают низкоско-  
ростному центрифугированию, в резуль-  
тате чего светопреломляющие тела, со-  
держащие MBS, осаждаются. Надосадо-  
чную жидкость выбрасывают, повторно  
взвешивают светопреломляющие тела,  
промывают и снова центрифугируют их.  
Опять выбрасывают надосадоочную жид-  
кость и получают препарат светопрелом-  
ляющих тел.

Препаратированные описанным обра-  
зом светопреломляющие тела при 25°C  
подвергают воздействию разных концен-  
траций водного раствора мочевины при  
разных значениях pH. Все забуферованные  
растворы содержат 100 ммоль трис-осно-

вания. Регулирование значения pH осуществляют добавлением HCl. Конечная концентрация светопреломляющих тел составляет 4 мг/мл раствора. Степень растворения определяют спектрофотометрически, принимая светопреломляющие тела полностью белковыми и используя коэффициент экстинкции  $E = 0,68$  при 277 нм в длине пути 1 см в качестве показателя концентрации белка 1 мг/мл. Исходную концентрацию определяют спектрофотометрически для полностью растворенной пробы.

Результаты описанного опыта представлены графически (фиг.1). Эти данные подтверждают, что регулировка значения pH с обеспечением щелочных условий существенно увеличивает степень солюбилизации.

**Пример 2.** Проводят аналогично примеру 1, но температуру выдерживают на уровне  $4^{\circ}\text{C}$  и значение pH регулируют и в сторону кислой и в сторону щелочной реакции. Все забуферованные растворы содержат 100 ммоль-трис-основания. Регулирование значения pH в сторону кислой реакции осуществляют добавлением уксусной кислоты.

Результаты этого опыта представлены графически (фиг.2). Сравнение данных фиг.1 и 2 показывает, что при постоянной концентрации раствора мочевины и данном значении pH степень солюбилизации при пониженных температурах ( $4^{\circ}\text{C}$ ) выше, чем при комнатной температуре ( $25^{\circ}\text{C}$ ).

**Пример А (сравнительный).** Содержащие MBS светопреломляющие тела готовят согласно примеру 1. Светопреломляющие тела смешивают с 10 М раствором мочевины без регулирования значения pH, так что окончательная концентрация тел составляет около 5,0 мг/мл. Затем смешивают раствор и в целях установления равновесия выдерживают его при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. Затем спектрофотометрическим способом определяют степень солюбилизации, которая составляет всего лишь около 2,9 мг/мл. Исходную концентрацию светопреломления тел определяют путем добавления достаточного количества раствора мочевины в целях полного их растворения и спектрофотометрического измерения полностью раство-

ренного раствора. Затем исходную концентрацию соответственно понижают.

**Пример Б (сравнительный).** Содержащие MBS светопреломляющие тела готовят согласно примеру 1. Затем смешивают с 8,0 М водным раствором мочевины без регулирования значения pH, так что окончательная концентрация тел составляет около 5,0 мг/мл. Раствор затем смешивают и в целях установления равновесия его выдерживают при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение ночи. Спектрофотометрическим способом определяют степень солюбилизации, которая составляет около 2,4 мг/мл. Исходную концентрацию светопреломляющих тел определяют путем добавления достаточного количества раствора мочевины в целях полного их растворения и спектрофотометрического измерения полностью растворенного раствора. Затем исходную концентрацию соответственно понижают.

**Пример 3.** Светопреломляющие тела, содержащие MBS и приготовленные, аналогично примеру 1, смешивают с небуферованным водным 4,5 М раствором мочевины так, что концентрация светопреломляющих тел составляет около 66 мг/мл. Значение pH раствора с помощью разбавленного раствора едкого натра повышают от 7 до 11. Осветлившийся раствор показывает полную солюбилизацию. Определенная по примеру 1 спектрофотометрическим анализом концентрация светопреломляющих тел составляет 66 мг/мл.

**Пример 4.** Содержащие MBS светопреломляющие тела, полученные по примеру 1, солюбилизируют в водном 7,5 М растворе мочевины, содержащем 100 ммоль триса при значении pH 10,5. Концентрацию мочевины поддерживают на разных уровнях, добавляют 100 ммоль триса, и выдерживают общую концентрацию белка около 1 мг/мл, определенную спектрофотометрическим анализом полностью растворенной пробы, добавляя определенное количество соответствующего раствора мочевины. Затем растворенный MBS окисляют, подвергая раствор воздействию воздуха и перемешивая его в течение суток. Результаты представлены графически (фиг.3). Выход мономера MBS указан в виде весовых процентов общего содержания MBS. Оптимальная натурация достигается

при концентрации мочевины около 4,5 М (фиг. 3).

**Пример 5.** Согласно примеру 4 содержащие MBS светопреломляющие тела сольбилизируют в водном 7,5 М растворе мочевины с содержанием 100 ммоль триса и со значением pH 10,5. После сольбилизации раствор разбавляют 100 ммоль триса до концентрации мочевины 4,5 М, после чего значение pH доводят до значений в пределах от 10,5 до 8,5. Затем отдельные растворы окисляют кислородом воздуха с перемешиванием в течение суток. Содержание мономера и олигомера определяют по данным БЖХ. Хотя результаты указывают на то, что зависимость эффективности натурации от значения pH в течение процесса окисления относительно ровная, но тенденция к увеличению эффективности по мере повышения значения pH наблюдается. Кроме того, процесс катализируемого основанием окисления протекает тем быстрее, чем более выражена щелочная реакция раствора.

**Пример 6.** К 850 мл водного 5,3 М раствора мочевины при 4°C добавляют 150 мл полученного по примеру 1 препарата светопреломляющих тел. Значение pH полученного 4,5 М раствора мочевины 50 мас. %-ного раствора едкого натра доводят до 11. Тела полностью растворяются, в результате чего получается общая концентрация MBS около 12,4 мг/мл. Затем раствор перемешивают при 4°C в течение ночи в целях окисления MBS. В соответствии с данными БЖХ-анализа окисленного раствора в результате получают выход мономера MBS, равный 80 мас. %.

**Пример 7.** Свиной S-метионилсоматотропин (MPS) экспрессируют в E.Coli. После выделения содержащих MPS светопреломляющих тел по описанному методу последние сольбилизируют при 4°C в 7,5 М растворе мочевины со значением pH 11,0, отрегулированным добавкой 90 ммоль триса. Затем на 1 л полученного раствора мочевины растворяют шарик светопреломляющего тела весом 113 мг (в мокром состоянии). Затем пробы разбавляют 90 ммоль триса и/или мочевиной в целях получения раствора мочевины концентрацией 4,5; 3,0 и 2,0 М с концентрацией MPS 4 мг/мл, считая на вес мокрого шарика светопреломляющих тел. Потом пробы

окисляют кислородом воздуха в течение ночи с перемешиванием. Данные БЖХ-анализа показывают, что оптимальный выход мономера MPS достигается при концентрации мочевины 3 М.

**Пример 8.** Аналогично примеру 7 сольбилизируют MPS при 4°C в водном 7,5 М растворе мочевины со значением pH 11, отрегулированным добавкой 90 ммоль триса. При этом готовят растворы трех разных концентраций (20,40 и 80 мг (мокрого) шарика на 1 мл указанного раствора мочевины). Пробы растворов разбавляют 90 ммоль триса и/или мочевиной в целях получения 3 М концентрации мочевины и концентраций MPS 1 мг/мл. Разбавленные растворы MPS с перемешиванием подвергают воздействию воздуха при 4°C в течение 56 ч. БЖХ-анализ показывает средний выход мономера MPS, равный 69 мас. %.

**Пример 9.** Проводят аналогично примеру 8, но сольбилизацию и натурацию осуществляют в присутствии 0,1 ммоль 1,4-дитиотрейтола. БЖХ-анализ показывает средний выход мономера MPS, равный 66 мас. %.

**Пример 10.** Три варианта BGN: Ala<sub>1</sub>, Ala<sub>1V126</sub> и Met<sub>1</sub>Val<sub>126</sub>, экспрессируют в E.Coli по известным приемам. Отдельные варианты BGN сольбилизируют и подвергают натурации аналогично примеру 1.

Содержащие соответствующие варианты BGN светопреломляющие тела выделяют аналогично примеру 1. Затем взвешивают в воде около 300 г (в мокром состоянии) тел с получением 1 л взвеси. Последнюю добавляют к 5 л 9 М мочевины и 108 ммоль триса, в результате чего получают сольбилизирующий раствор, включающий соответствующий вариант BGN в 7,5 М мочевины и 90 ммоль триса при значении pH 10,5 и 4°C. После перемешивания в течение нескольких минут сольбилизацию завершают. Затем медленно добавляют 4 л холодной воды с получением предназначенного для натурации раствора, содержащего соответствующий вариант BGN в 4,5 М мочевины и 54 ммоль триса при значении pH 10,5 и при 4°C. Раствор перемешивают и соответствующий BGN окисляют, подвергают раствор воздействию воздуха в течение 48 ч. Растворы с окисленными вариантами BGN подвергают БЖХ-анализу, который для

всех трех вариантов BGN показывает выход мономера 60-70 мас.%.  
 П р и м е р 11. Структурную гомологию соматотропинового белка, полученного описанным образом, и соматотропина, вырабатываемого гипофизом, определяют методом Circular dichroism. Сравнивают MBS и вариант Ala<sub>1</sub> соматотропина BGN с бычьим соматотропином. Пробы растворяют в растворе 50 ммоль бикарбоната натрия при значении pH 9,5 и анализируют их описанным приемом.

Данные этого анализа показывают, что полученный описанным образом рекомбинантный соматотропин после натурации имеет свою нативную конформацию.

Спектральные данные приведены в табл. 1 и 2.

П р и м е р 12. Содержащие MBS светопреломляющие тела приготавливают аналогично примеру 1 и смешивают с небуферованным 1,0 М водным раствором мочевины при 4°C. Добавкой гидроксида натрия доводят значение pH до 12,1 и выдерживают его на этом уровне. Осветление раствора говорит о завершении сольubilизации. Концентрацию светопреломляющих тел определяют аналогично примеру 1 методом спектрофотометрического анализа, которая составляет около 10 мг/мл.

П р и м е р 13. Содержащие MBS светопреломляющие тела приготавливают аналогично примеру 1. Затем их растворяют в 3,0 М раствора диметилсульфоне при 28°C (pH 11,8) при концентрации MBS 2 мг/мл. В результате окисления кислородом воздуха растворенного MBS получают продукт, который (судя по степени межмолекулярной связи), только незначительно отличаются от продукта, полученного с применением 4,5 М раствора мочевины со значением pH 11,3 (50 ммоль триса) при 5°C.

Сольubilизованные и натурированные описанным образом соматотропины затем очищаются по стандартным хроматографическим приемам. Биоактивность соматотропинов показана положительной реакцией, вызванной ими в испытаниях, основанных на росте крыс (rat growth bioassy).

При этом биоактивность гетерологического соматотропина определяют относи-

тельно известного количества соматотропинового материала (например, бычьего или свиного гипофизарного соматотропина), устанавливая взаимосвязь между увеличением в весе крыс, подвергнутых гипофизэктомии, и разными количествами введенного в их организм испытуемого материала. Наклон регрессии увеличения в весе тела в сравнении с дозами введенного специфического соматотропинового материала сравнивают с известным стандартным материалом (например, гипофизарным) и подсчитывают относительную биоактивность гетерологического соматотропинового материала в U ед./мг гормона роста.

Бычий N-метионилсоматотропин, сольubilизированный и натурированный по предлагаемому методу, очищают, а затем вводят в организм молочных коров. Молочные коровы, которым введен подобный препарат, продуцируют на 10-40 мас.% больше молока, чем контрольные животные.

Выражение "соматотропин" включает соматотропины млекопитающих, например человеческий, овечий, свиной и бычий соматотропины, и другие соматотропины, например птичий, а также системы, включающие аналоги и гомологи встречающегося в природе белка, проявляющего соматотропиноподобную биоактивность, например пролактин и лактоген (HPL).

Гетерологические белки - это белки, которые обычно не вырабатываются клетками хозяина. Благодаря технологии рекомбинации ДНК стало возможно экспрессировать относительно большие количества гетерологических белков из трансформированных клеток хозяина. Однако, эти посторонние белки часто замаскированы в нерастворимых светопреломляющих телах в цитоплазме клеток хозяина.

Сложение - восстановление общей конформации белка, достаточной для осуществления окисления надлежащим образом. Процесс сложения осуществляется путем сокращения денатурирующего действия мочевины, если необходимо, за счет понижения ее концентрации до нужного уровня для обеспечения взаимодействия последовательности аминокислот белка и достижения нативной вторичной и третичной структур.

Окисление - образование внутримолекулярных дисульфидных связей в целях получения устойчивой нативной конформации, обеспечивающей требуемую биологическую активность.

Мягкий окислитель - вещество, содействующее окислению сульфгидрильных групп для образования внутримолекулярных дисульфидных связей без окисления других заместителей данного белка. Хотя можно пользоваться и такими мягкими агентами, как перекись водорода, но вполне достаточно (и предпочтительно) использовать для этих целей воздух.

Биологическая активность - способность соматотропина к осуществлению его предполагаемой физиологической реакции *in vivo*. В случае отсутствия испытания на специфическом виде животного *in vivo* биологическую активность можно определять путем проведения подходящих биологических испытаний. Подходящим биоиспытанием для соматотропинов по предлагаемому способу является биоиспытание для определения увеличения в весе у крыс. При этом испытании определяют биоактивность соматотропиновых препаратов по сравнению с известными препаратами (например, экстрагированным нативным соматотропином), устанавливая связь между степенью увеличения в весе у крыс, подвергнутых гипопизэктомии, и разными количествами введенного в организм крыс препарата.

Соматотропины - это гормоны, выделяемые аденогипофизом (передней долей гипофиза) и стимулирующие рост скелета и увеличение веса тела. Соматотропины обычно содержат ~191 аминокислотных остатков и имеют мол.массу ~22000 дальтон. Полная последовательность аминокислотных остатков установлена для соматотропинов разных видов, в том числе людей и животных, например птиц (птичий соматотропин), овец

(овечий соматотропин), свиней (свиной соматотропин), крупного рогатого скота (бычий соматотропин).

В табл.3 изображена первичная структура соматотропинов разных видов животных, причем BGN - бычий соматотропин, PGN - свиной соматотропин, OGN - овечий соматотропин, AGN - птичий соматотропин, HGN - соматотропин человека, символ "X" обозначает промехуток в последовательности и вставлен для иллюстрации расположения типовых соматотропинов. При нумерации аминокислотных остатков специфической последовательности эта вставка не принимается во внимание, например в BGN позиция 126 представляет собой Leu (или Val, как в случае аллельного варианта, использованного в примере 10).

Табулированные относительные количества специфических аминокислот, основанные на описанных последовательностях, приведены в табл.4.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ выделения соматотропного белка из светопреломляющих тел клеток хозяина, включающий проведение солюбилизации с последующей натурацией и очисткой целевого продукта, отличающийся тем, что, с целью упрощения способа и повышения качества целевого продукта за счет сохранения его нативных свойств, в качестве клеток хозяина используют бактерии *E.Coli*, солюбилизацию проводят 4,5-10 М раствором мочевины или диметилсульфона при pH 9-12,1 и температуре 4-25°C, а натурацию осуществляют в водном растворе 2-5 М мочевины при pH 9-12,1 и температуре 4-25°C, причем солюбилизацию проводят в присутствии или отсутствии восстанавливающего агента, а натурацию - в присутствии мягкого окислителя.

Т а б л и ц а 1

Параметры	Данные по УФ и видимой области		
	Гипофиз М-34-12162	MBS М-36-01203	Вариант Ala <sub>1</sub> 2561190-20
$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	278,2	278,2	278,5
$E_m$	15,042 ± 440	14,935 ± 216	15,150 ± 100
$A_{1,0\text{см}}^{1\%}$	0,690	0,680	0,693

Примечание.  $E_m$  - коэффициент экстинкции при 278 нм.

$A_{1,0\text{см}}^{1\%}$  - нормализованная абсорбция 1 мг/мл раствора в ячейке размером 1,0 см при 278 нм.

Т а б л и ц а 2

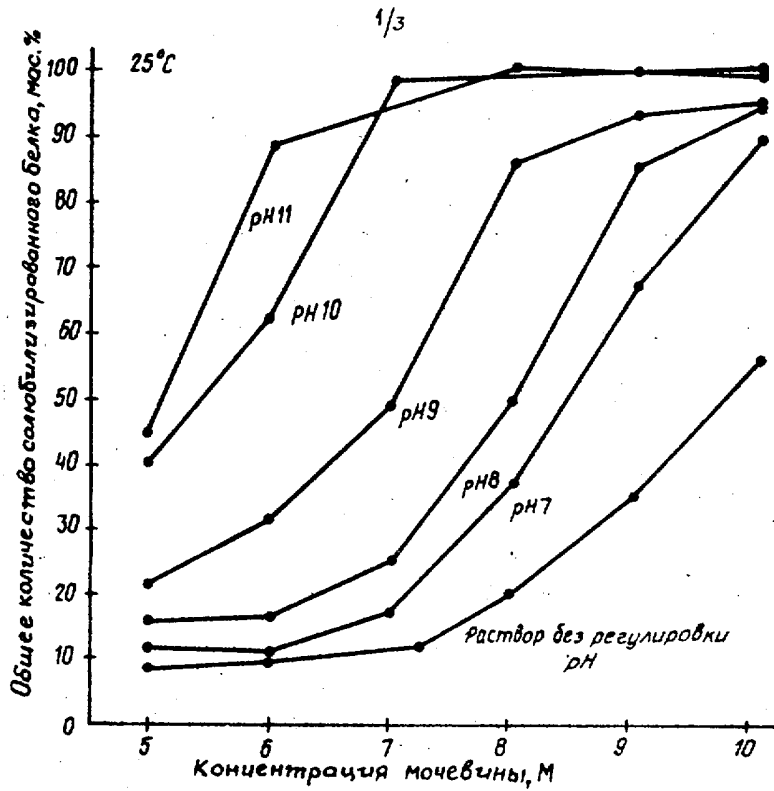
Данные по $\lambda$ (нм), полученные методом Circular dichroism	Гипофиз М-34-12162	MBS М-36-01203	Вариант Ala <sub>1</sub> 2561190-20
291	-51,5	-53,8	-59,0
285	-51,5	-53,8	-59,0
265	+28,0	+30,0	+33,0
221	-16,725	-17,600	-18,500
$\alpha$ -спираль (%)	47	50	53

	1		20
BGH	Phe-Pro-Ala-Met-Ser-Leu-Ser-Gly-Leu-Phe-Ala-Asn-Ala-Val-Leu-Arg-Ala-Gln-His-Leu-		
PGH	-----Pro-----Ser-----		
OGH	-----		
AGH	-----Pro-----Asn-----		
HGH	-----Thr-Ile-Pro-----Arg-----Asp-----Met-----His-Arg-----		
		30	40
BGH	His-Gln-Leu-Ala-Ala-Asp-Thr-Phe-Lys-Glu-Phe-Glu-Arg-Thr-Tyr-Ile-Pro-Glu-Gly-Gln-		
PGH	-----Tyr-----Ala-----		
OGH	-----		
AGH	-----Leu-----Gln-----Tyr-----Asp-----		
HGH	-----Phe-----Tyr-Gln-----Glu-Ala-----Lys-Glu-----		
		50	60
BGH	Arg-Tyr-Ser--X--Ile-Gln-Asn-Thr-Gln-Val-Ala-Phe-Cys-Phe-Ser-Glu-Thr-Ile-Pro-Ala-		
PGH	-----Ala-----Ala-----		
OGH	-----		
AGH	-----Thr-----Asn-Lys-----Ser-----Ala-----Tyr-----		
HGH	Lys-----Phe-Leu-----Pro-----Thr-Ser-Leu-----Ser-----Thr-----		
		70	80
BGH	Pro-Thr-Gly-Lys-Asn-Glu-Ala-Gln-Gln-Lys-Ser-Asp-Leu-Glu-Leu-Leu-Arg-Ile-Ser-Leu-		
PGH	-----Asp-----Arg-----Val-----Phe-----		
OGH	-----		
AGH	-----Asp-Asp-----Met-Gly-----Phe-----		
HGH	-----Ser-Asn-Arg-Glu-----Thr-----Asn-----Gln-----		
		90	100
BGH	Leu-Leu-Ile-Gln-Ser-Trp-Leu-Gly-Pro-Leu-Gln-Phe-Leu-Ser-Arg-Val-Phe-Thr-Asn-Ser-		
PGH	-----Val-----		
OGH	-----		
AGH	Val-----Thr-----Val-----Tyr-----Lys-----Asn-----		
HGH	-----Glu-----Val-----Arg-Ser-----Ala-----		
		110	120
BGH	Leu-Val-Phe-Gly-Thr-Ser-Asp-Arg--X--Val-Tyr-Glu-Lys-Leu-Lys-Asp-Leu-Glu-Glu-Gly-		
PGH	-----		
OGH	-----		
AGH	-----Phe-----		
HGH	-----Tyr-----Ala-----Asn-Ser-Asp-----Asp-Leu-----		
		130	140
BGH	Ile-Leu-Ala-Leu-Met-Arg-Glu-Leu-Glu-Asp-Gly-Thr-Pro-Arg-Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-		
PGH	-----Gln-----Ser-----		
OGH	-----Val-----		
AGH	-----Gln-----Arg-Ser-----Gly-Pro-----Leu-----Arg-----		
HGH	-----Gln-Thr-----Gly-Arg-----Ser-----Thr-----Phe-----		
		150	160
BGH	Gln-Thr-Tyr-Asp-Lys-Phe-Asp-Thr-Asn-Met-Arg-Ser-Asp-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys-Asn-Tyr-		
PGH	-----Leu-----		
OGH	-----		
AGH	Pro-----Ile-His-Leu-----Asn-Glu-----		
HGH	-----Ser-----Ser-His-Asn-----		
		170	180
BGH	Gly-Leu-Leu-Ser-Cys-Phe-Arg-Lys-Asp-Leu-His-Lys-Thr-Glu-Thr-Tyr-Leu-Arg-Val-Met-		
PGH	-----Lys-----Ala-----		
OGH	-----		
AGH	-----Lys-----Val-----Lys-----		
HGH	-----Tyr-----Met-Asp-----Val-----Phe-----Ile-Val-----		
		190	
BGH	Lys-Cys-Arg-Arg-Phe-Gly-Glu-Ala-Ser-Cys-Ala-Phe-		
PGH	-----Val-----Ser-----		
OGH	-----		
AGH	-----Ser-Asn-----Thr-Ile-----		
HGH	Gln-----X-----Ser-Val-----Gly-----Gly-----		

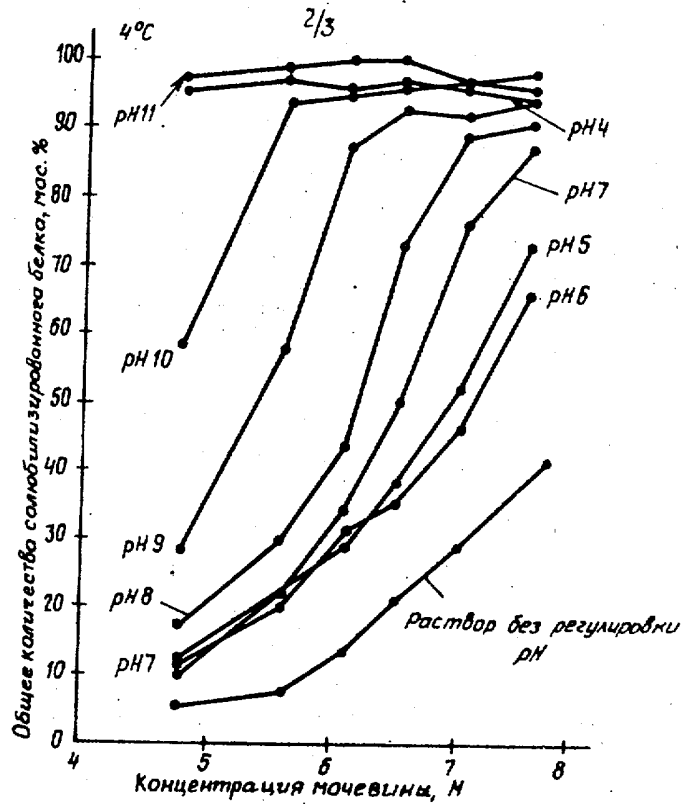
Т а б л и ц а 4

Аминокис- лота	Соматотропин				
	Челове- ческий	Бычий	Овечий	Свиной	Птичий
Аспарагино- вая	11	10	10	10	11
Аспарагин	9	6	6	5	9
Треонин	10	12	12	8	11
Серин	18	13	13	15	11
Глутамино- вая	14	13	13	13	12
Глутамин	13	11	11	12	10
Пролин	8	6	6	7	9
Глицин	8	10	9	8	7
Аланин	7	14	14	17	12
Валин	7	6	7	7	8
Метионин	3	4	4	3	4
Изолейцин	8	7	7	6	6
Лейцин	26	27	27	26	26
Тирозин	8	6	6	7	8
Фенилаланин	13	13	13	13	11
Гистидин	3	3	3	3	4
Лизин	9	11	11	11	14
Аргинин	11	13	13	12	12
Триптофан	1	1	1	1	1
Цистеин	4	4	4	4	4

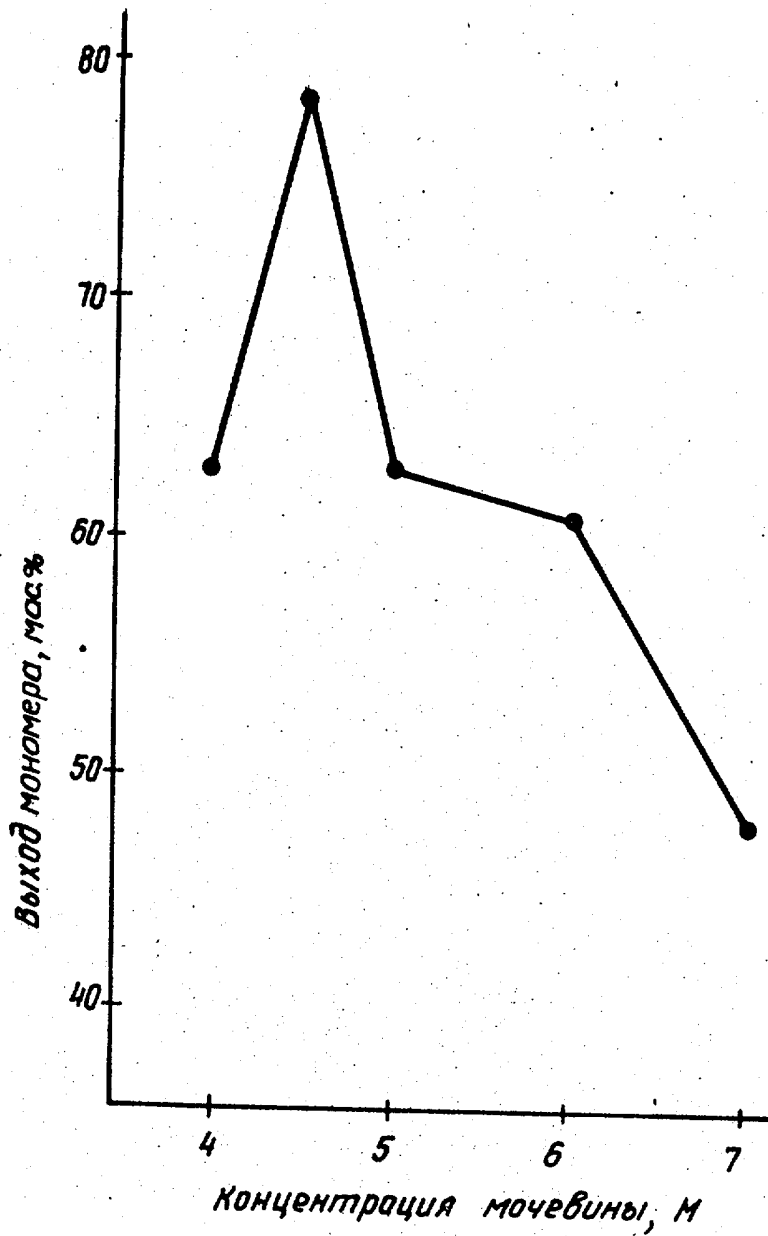




Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг.3

Составитель А.Агуреев

Редактор И.Дербак

Техред М.Моргентал

Корректор Т.Палий

Заказ 1463

Тираж 539

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул. Гагарина, 101