



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 131028

(13) C2

(51) МПК

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 1/32 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2023 04851

(22) Дата подання заявки: 16.10.2023

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: 16.07.2026

(41) Публікація відомостей
про заявку: 16.04.2025, Бюл.№ 16

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: 15.07.2026, Бюл.№ 28

(72) Винахідник(и):

Литюга Олег Віталійович (UA),
Карбовський Леонід Леонідович (UA)

(73) Володілець (володільці):

АКЦІОНЕРНЕ ТОВАРИСТВО "ФАРМАК",
вул. Кирилівська, 63, м. Київ, 04080 (UA)

(74) Представник:

Долгова Наталія Юріївна, реєстр. №403

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

US 2016/0297850 A1, 13.10.2016

WO 01/12778 A2, 22.02.2001

MONDAL S. et al. Flocculation of yeast
suspensions by a cationic flocculant // Powder
technology. 2013. Vol. 235. P. 426-430

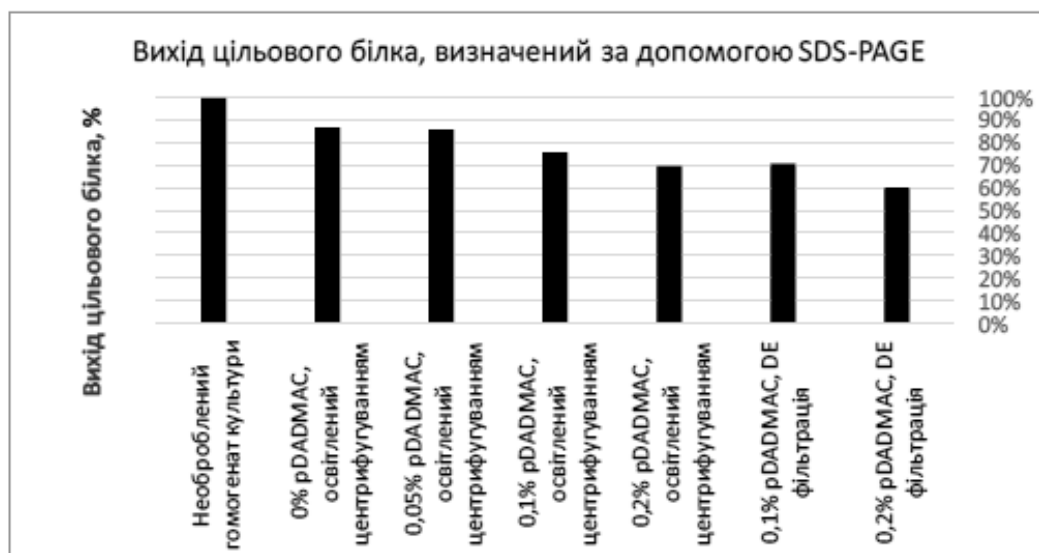
BURGSTALLER D. et al. Continuous cell
flocculation for recombinant antibody
harvesting // J Chem technol biotechnol.
Research article. 2018. Vol. 93. P. 1881-1890

(54) СПОСІБ ПОКРАЩЕННЯ ПРОЦЕСУ ОЧИСТКИ БІЛКІВ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу покращеної очистки білків, синтезованих бактеріальними продуцентами з використанням полікатіонних флокулянтів, від клітинного сміття з отриманням розчину високої чистоти за допомогою полікатіонних полімерів/флокулянтів після етапів гомогенізації клітинної суспензії, рефолдингу цільового білка та ферментолізу цільової молекули.

UA 131028 C2



Фіг. 7. Графік «Вихід цільового ензиму гідроксистероїддегідрогенази в залежності від концентрації Clarisolve pDEDMAC в гомогенаті визначений за допомогою SDS-PAGE»

Винахід представляє собою біотехнологічний метод, що може використовуватись для освітлення та очистки біомолекул в фармацевтичній галузі.

Передумова створення винаходу.

Відомо, що процес освітлення/флокуляції широко використовується в науці, промисловості [14-17] та очистці стічних вод [13, 16-18]. Також, в наш час, набирають популярність технології осадження клітин при напрацюванні моноклональних антитіл за допомогою полікатионних полімерів [16-18]. Оскільки поверхня клітин ссавців негативно заряджена, полікатионні полімери агрегують клітини, і цим збільшують розмір часток, що сприяє осадженню. До поширених полімерів, що використовуються для клітинної флокуляції, належать поліетиленімін (PEI), полідіалілдиметиламоній хлорид (pDADMAC), хітозан і полімери, що реагують на стимул, такі як модифікований поліаліламін (mPAA) [15, 17].

Для очищення напрацьованих IgG був розроблений ефективний процес очищення, спрямований на хроматин, для культуральної рідини клітин. Дана методика дозволяє видалити з розчину більшість ДНК хазяїна та гістони, а також зменшити концентрацію негістонових білків-хазяїна [22].

Альтернативний підхід передбачає ізоляцію бруду клітин-хазяїна методом двофазної екстракції безпосередньо перед процесом рефолдинга цільової молекули білка [10, 11]. Перші фундаментальні роботи по селективному розділенню білків в рідкій фазі методом коацервації були проведені Р. L. Dubin, J. Gao, K. Mattison та J. Xia в 1994 році [35, 36].

Вже існують розробки осадження вірусів наночастками колоїдного оксиду кремнію [21]. Є відомими розробки в яких використовують прес-фільтрацію з кізельгуром, котрим досягають зменшення клітинного бруду [19-20]. Так, Palombarini (2019) досліджував застосування діатомової землі (кізельгур) як допоміжного фільтруючого агента в тандемі з ультрафільтрацією, впроваджуючи нові методи видалення білків і молекул ДНК клітин-хазяїв без використання хроматографічного очищення [19]. Глибинна фільтрація разом з центрифугуванням і ультрафільтрацією являються найпоширенішими методами, які використовуються для первинного освітлення клітин в промисловій біотехнології.

Глибинна фільтрація здатна зменшувати біологічне навантаження, її часто використовують у вторинному процесі освітлення [33], але її ефективність далека від ідеалу, якщо додатково не використовувати освітлюючі/флокулюючі агенти. Методом вибіркової флокуляції/освітлення, також, можливо згладити наслідки другої, не менш важливої проблеми сучасної біотехнології – рефолдинг цільового білка з тілець включення [2-4, 9-12, 23-32].

Але, збільшення потужностей біотехнологічного виробництва породжує нові проблеми і виклики для науковців і розробників [1-8]. При напрацюванні білкової цільової молекули біотехнологічним шляхом, необхідно видалити домішки, включаючи білки клітин-хазяїна, ДНК клітини-хазяїна, ендотоксини та вірусні частинки, окислені форми цільової молекули та олігомерні агрегати цільової молекули. Методи очищення мають бути масштабованими, ефективними, рентабельними, надійними та відповідати суворим вимогам щодо чистоти кінцевого продукту. Сучасні методи очищення зазвичай включають багатоетапні хроматографічні розділення. Звичайні етапи колонкової хроматографії – ефективні та надійні, але, як правило, при масштабуванні методів у виробництві хроматографія показує свої вразливі сторони. По-перше, має низьку ємність і пропускну здатність продукту, щоб компенсувати це при масштабуванні виробництва треба суттєво збільшувати об'єм колони та витрати на сорбенти, смоли та рухомі фази. По-друге, неякісна пробопідготовка (розчину для сорбції) при масштабуванні хроматографічної методики може сильно ускладнити виробничий процес, або навіть, зробити його неможливим.

В заявленому винаході застосовуються наступні терміни, визначення та скорочення.

AIEC – Anion-exchange chromatography – аніонообмінна хроматографія;

CIEC – Cation-exchange chromatography – катіонообмінна хроматографія;

FGFs – Fibroblast growth factors – фактори росту фібробластів;

GSH/GSSG – відновлений глутатіон/окислений глутатіон;

hcDNA – Host-cell DNA – дезоксирибонуклеїнова кислота клітин-хазяїна;

HIC – Hydrophobic Interaction Chromatography – хроматографія гідрофобної взаємодії;

HSDH – Hydroxysteroid dehydrogenase – гідроксистероїддегідрогеназа;

IEC – Ion-exchange chromatography – іонообмінна хроматографія;

IFN – Interferon – інтерферон;

IMAC – Immobilized metal affinity chromatography – іммобілізована металоафінна хроматографія;

mPAA – Modified polyallylamine – модифікований поліаліламін – полікатионний полімер з високою щільністю заряду.

pDADMAC – Polydiallyldimethylammonium chloride – полі-діалілдиметиламоній хлорид – полікатионний полімер з високою щільністю заряду;

pI – Isoelectric point – ізоелектрична точка – це стан цвітер-іона, коли загальний заряд молекули дорівнює нулю;

5 pK – Dissociation constant – константа дисоціації;

RP-HPLC – ЗФ-ВЕРХ – Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography – зворотно-фазова високоефективна рідинна хроматографія;

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis – ДСН-ПААГ електрофорез – електрофорез у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію;

10 SEC – Size-exclusion chromatography – ексклюзійна хроматографія;

UF – Ultrafiltration – ультрафільтрація;

β -ME – 2-Mercaptoethanol – 2-меркаптоетанол;

АФІ – Active pharmaceutical ingredient – активний фармацевтичний інгредієнт;

15 Коацервація – Coacervation – це утворення другої рідкої фази збагаченої на розчинену речовину, що перебуває в термодинамічній рівновазі з фазою. Коацервація характерна для некристалічних макромолекул [35];

ЛПС – Lipopolysaccharides – ліпополісахариди;

20 Пептид – природна або синтетична сполука, що містить два або більше амінокислотних залишків (однакових або різних), з'єднаних між собою пептидними (амідними) зв'язками типу – CO–NH–, у лінійний або циклічний ланцюг (олігопептид, поліпептид і циклопептиди). Циклічні пептиди можуть бути гомодетні (цикл замкнений лише пептидними зв'язками) та гетеродетні циклопептиди (цикл замкнений за участю бічних функціональних груп, або щонайменше одного непептидного зв'язку, наприклад дисульфідного, лактамного або лактонного), залежно від того, замкнулись кінцеві чи бічні функціональні групи (наприклад, –NH₂, –COOH, –OH, –SH). Пептиди можуть містити кінцеві модифікації (ацетилювання N-кінця, амідування C-кінця) та заміщення в ланцюгу, що не порушують їх пептидну природу. У деяких класифікаціях пептидами умовно вважають амінокислотні ланцюги невеликої довжини до 40-50 мономерних одиниць, тоді як довші ланцюги називають поліпептидами або білками.

30 Рефолдинг білка – Protein refolding – це повторне згортання цільового білку біотехнологічним шляхом;

РПІГ – Refolded precursor of insulin glargine – рефолдований попередник інсуліну гларгін;

35 Ферментація – Fermentation – це метаболічний процес, який викликає хімічні зміни в органічних речовинах під дією ферментів чи продуцентів (наприклад, геномодифіковані дріжджі чи E.coli), що призводить до отримання цільового продукту;

Ферментоліз – Fermentolysis – це процес отримання цільового продукту в результаті впливу ензима на молекулу попередника;

40 Флокуляція – Flocculation – це фізико-хімічний процес злипання дрібних частинок дисперсних систем у більші агрегати. Збільшені частки дисперсної фази представляють собою великі пухкі агрегатами – флокули, які здатні до швидкого осідання або злипання.

З сучасного рівня техніки відомо, що в патенті США 6927282 (заявка від 27.08.2001) «Освітлення суспензій білкового осаду за допомогою аніонних полімерних флокулянтів», розкритий метод очищення білкових суспензій, що містять розчинні та нерозчинні компоненти, шляхом флокуляції з аніонними полімерами, такими як, поліакриламід, картопляний крохмаль або модифікована целюлоза. Процедура покращує ефективність розділення твердої/рідкої фази, та може мінімізувати, або виключити потребу у центрифугуванні та/або фільтрації у великомасштабних біотехнологічних процесах. Метод особливо добре підходить для очищення та освітлення білкових суспензій, що містять розчинний мономер соматотропіну та олігомери соматотропіну, з використанням поліакриламідних і полісахаридних флокулянтів. Щоб отримати селективне розділення мономерного соматотропіну від олігомерів, треба досягти таких умов, при яких мономер буде розчинним, а олігомери повинні бути не розчинні.

Також, в патенті США 11427809 (заявка від 25.05.2017) «Методи виділення аденоасоційованого вірусу з використанням полідіалкіламонієвої солі», захищений спосіб селективного очищення аденоасоційованого вірусу (AAV) з рідкої біомаси за допомогою флокулянта. У варіантах здійснення винаходу флокулянт являє собою полідіалілдіалкіламонієву сіль, наприклад, полідіалілдиметвламоній хлорид (pDADMAC). В заявленому винаході використовуються pDADMAC – це полікатионний полімер з високою щільністю заряду. Щільність заряду робить його добре придатним для флокуляції.

60 В патентах на винахід US8362217 (заявка 20.12.2007) та US10233211 (заявка 31.07.2013) «Очищення білків» наведені полімери, що реагують на подразники. Полімер стає розчинним у

розчиннику за певного набору умов, таких як: рН, концентрація солі або температура, і стає нерозчинним, і випадає в осад в розчині при зміні умов (температура, концентрація солі або рН). Лише після осадження в розчині, полімер здатний зв'язуватися з однією або декількома потрібними біомолекулами у клітинному бульйоні за допомогою ліганду або функціональної групи на полімері. Потім осад видаляється з розчину, наприклад, відфільтровується. Потрібну біомолекулу, що представляє інтерес, шляхом елюювання вилучають з осаду для подальшої очистки.

В патенті US8163886 «Очищення білків» (заявка 20.12.2007) захищений спосіб очищення моноклонального антитіла із суміші. Даний винахід описує полімери, що реагують на подразники. Полімер стає розчинним у розчиннику за певного набору умов, таких як: рН, концентрація солі або температура, і стає нерозчинним і випадає в осад в розчині при зміні умов (температура, концентрація солі або рН). Перебуваючи в розчиненому стані, полімер здатний зв'язуватися з обраною сполукою в розчині/суспензії, такою як: еукаріотичні клітини, клітинні фрагменти, ліпіди, ДНК, РНК, білок клітин-хазяїна, ендотоксини і віруси у клітинному бульйоні, але випадають в осад після зміни умов. Потім осад видаляється з розчину, наприклад, відфільтровується. Потрібну біомолекулу, що представляє інтерес, шляхом елюювання вилучають з осаду для подальшої очистки.

Заявлений винахід, в порівнянні з патентами US8362217, US10233211 і US8163886 – полікатіонний полімер, котрий використовується для селективної флокуляції, представляє собою розчинну молекулу, яка у великих межах рН, іонної сили та температури, в залежності від цільового білка, який повинен залишитися розчинним в розчині, здатний осаджувати клітинний бруд продуцента (нуклеїнові кислоти, ліпополісахариди, муреїн, білки клітин-хазяїна та агрегатів білку). При утворенні агрегації полікатіонного полімеру з негативно зарядженими молекулами/частками відбувається утворення флокул, що веде до утворення осаду.

Близьким аналогом створеного методу є розробка за патентом США № 7947813 «Поліелектролітне осадження та очищення білків» (заявка US20080193981A1). В патенті цільовим об'єктом є культуральна рідина ліній клітин-хазяїна ссавців, що містить білки, які були секретовані в середовище в нативному вигляді.

Метою даного винаходу є створення методу очистки білків, синтезованих бактеріальними продуцентами з використанням полікатіонних флокулянтів, який відрізняється тим, що виділення та очистку проводять шляхом додавання полікатіонних флокулянтів до: суспензії гомогенату бактеріальної культури, що містить розчинний цільовий білок, або до розчину рефолдованого білка, або, також, до розчину/суспензії після етапу ферментолізу.

Даний спосіб очистки білків не обмежується тільки на приклади очистки білків, що наведені в огляді, а може поширюватися на інші білки, які поширені в світі.

В наведених дослідженнях винаходу використовуються полікатіонні полімери Clarisolve mPAA і Clarisolve pDADMAC. Флокуючі агенти були надані компанією Merck.

Clarisolve mPAA – це полікатіонний полімер з високою щільністю заряду. Щільність заряду робить його добре придатним для флокуляції. Цей полімер/флокулянт був створений компанією Merck для освітлення напрацювань з моноклональними антитілами. Особливість mPAA в тому, що він осаджується при додаванні аніонного двовалентного фосфату. Додавання такого стимулу ініціює утворення фокусів, а також осадження залишкового полімеру, який можна легко видалити з бульйону клітинної культури [15, 17]. При додаванні в середовище з культурою клітин полімер Clarisolve mPAA (при типовій концентрації 0,05-0,25%) швидко осаджує негативно заряджені клітини, нуклеїнові кислоти і клітинне сміття [17].

Clarisolve pDADMAC – це полікатіонний полімер з високою щільністю заряду. Щільність заряду робить його добре придатним для освітлення/флокуляції. Полімер pDADMAC був вперше отриманий та досліджений в 1957 році професором Джорджем Батлером з Університету Флориди. Цей полімер/флокулянт створений для очищення води і освітлення стічних вод. При додаванні у водне середовище, або в суспензію полімер Clarisolve pDADMAC (при типовій концентрації 0,01-0,2%) швидко осаджує негативно заряджені колоїдні частки [15]. Ефективний в осадженні неорганічних і органічних частинок, таких як мул, глина, водорості, бактерії та віруси.

СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

Винахід пропонує способи виділення та очищення білків, шляхом осадження нецільових молекул в розчині/гомогенаті прокаріотичних клітин продуцентів отриманих біотехнологічним шляхом.

В заявленому винаході – цільовий білок синтезується бактерією внутрішньоклітинно. Флокулянт обробляється:

а) гомогенат культури продуцента, при умові, якщо бактерією-продуцентом синтезувався цільовий білок в нативній розчинній формі;

б) розчин рефолдованого білка, якщо бактерією-продуцентом синтезувався ненативний цільовий білок у вигляді тілець включень;

5 в) розчин після ферментолізу.

Це призводить до осадження:

а) клітинного сміття, hcDNA та ендотоксинів, які вивільняються при руйнуванні бактеріальних клітин,

10 б) агрегатів цільового білку, які утворюються у великій кількості особливо під-час етапу Рефолдинг,

в) продуктів лізису, після етапу ферментолізу, якщо рІ нижче та/або загальний від'ємний заряд молекули буде більш виражений ніж в цільовій молекулі.

Селективне освітлення/флокуляція клітинного сміття продуцента, та/або білкових агрегатів, та/або продуктів лізису полікатіонними полімерами/флокулянтами рекомендовано

15 проводити:

а) після етапу гомогенізація клітинної суспензії;

б) після етапу рефолдинг цільового білка;

в) після етапу ферментоліз цільової молекули;

20 Після стадії освітлення/флокуляції можуть слідувати: катіонообмінна хроматографія (CIEC), аніонообмінна хроматографія (AIEC), хроматографія гідрофобних взаємодій (HIC), афінна хроматографія (наприклад, IMAC), ексклюзійна хроматографія (SEC), ультрафільтрація (UF), ферментоліз, або навіть інші стадії осадження чи коацервації.

25 Так як, рК ЛПС, муреїну та нуклеїнових кислот та рІ більшості білків клітин-хазяїна, зазвичай, нижчий рІ цільового білка [34], то полікатіонні полімери/флокулянти потенційно здатні вибірково осадити клітинний бруд, і при цьому, залишити цільовий білок розчинним в розчині.

30 Метод селективної флокуляції/освітлення, для деяких глобулярних білків, за умов, якщо працювати з полікатіонними полімерами/флокулянтами в межах значень рН, котрі будуть вищі ізоелектричної точки цільового білка, дозволяє зменшити присутність, або навіть позбутися від агрегатів цільового білка в розчині. Так як, при зростанні ланцюга/ланцюгів у білковому агрегаті, незважаючи від природи міжмолекулярного зв'язку (S-S місток, чи гідрофобні взаємодії) загальний від'ємний заряд комплексу починає зростати (або позитивний заряд, якщо рН середовища нижче рІ цільового білка) – наближається до суми зарядів всіх мономерів комплексу. При агрегації великих протеїнів з більшою амінокислотною послідовністю, котрі

35 мають більше заряджених амінокислот зростання загального заряду більш виражене. Стадії які передують етапу Селективна флокуляція клітинного сміття продуцента полікатіонними полімерами/флокулянтами після етапу Руйнування (гомогенізація) клітин:

Етап 1. Ферментація;

Етап 2. Сепарація біомаси (клітин);

Етап 3. Руйнування (гомогенізація) клітин;

40 Далі проводиться етап селективна флокуляція клітинного сміття продуцента полікатіонними полімерами/флокулянтами (цільова молекула залишається розчинна в розчині).

Стадії які передують етапу Селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами після етапу Рефолдинг цільового білка:

Етап 1. Ферментація;

45 Етап 2. Сепарація біомаси (клітин);

Етап 3. Руйнування (гомогенізація) клітин;

Етап 4. Сепарація тілець включення.

Етап 5. Відмивання тілець включення (даний етап в деяких методиках може бути відсутнім).

Етап 6. Рефолдинг цільового білка.

50 Далі проводиться етап селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами (цільова молекула залишається розчинна в розчині).

В деяких методиках перед етапом Селективна флокуляція додатково проводиться етап Ультрафільтрація. Стадії які передують етапу Селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами після етапу Ферментоліз, за умови, якщо цільовий білковий

55 попередник напрацьовувався в ненативній формі – у вигляді тілець включень:

Етап 1. Ферментація;

Етап 2. Сепарація біомаси (клітин);

Етап 3. Руйнування (гомогенізація) клітин;

Етап 4. Сепарація тілець включення.

60 Етап 5. Відмивання тілець включення (даний етап в деяких методиках може бути відсутнім).

Етап 6. Рефолдинг цільового білка.

Етап 7. Ферментоліз (В деяких методиках перед етапом Ферментоліз додатково проводиться етап Ультрафільтрація, і/або етап Фільтрація, і/або етап Селективна флокуляція №1, і/або ряд хроматографічних розділень).

5 Далі проводиться етап селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами (цільова молекула залишається розчинна в розчині).

Стадії які передують етапу Селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами після етапу Ферментоліз, за умови, якщо цільовий попередник напрацьовувався внутрішньоклітинно в нативній розчинній формі:

10 Етап 1. Ферментація;

Етап 2. Сепарація біомаси (клітин);

Етап 3. Руйнування (гомогенізація) клітин;

Етап 4 Сепарація суспензії гомогенату.

15 Етап 5. Ферментоліз (В деяких методиках перед етапом Ферментоліз додатково проводиться етап Ультрафільтрація, і/або етап Фільтрація, і/або етап Селективна флокуляція №1, і/або ряд хроматографічних розділень).

Далі проводиться етап селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами (цільова молекула залишається розчинна в розчині).

Одним з аспектів винаходу є спосіб очищення розчинних білків, який включає:

20 а) регулювання кислотності або концентрації солі в суміші, що містить цільовий білок, де цільовий білок отримують з бактеріальних клітин-продуцентів;

б) додавання позитивно зарядженого поліелектроліту, в результаті чого, утворюється флокули комплексів, які утворює полікатіонний полімер/флокулянт з ДНК, ліпополісахаридами, ендотоксинами, муреїном, білками клітин-хазяїна та олігомерними агрегатами цільового

25 ненативного білка;

в) відділення (сепарація) осаду від розчину цільового розчиненого білка.

Приклади, що відтворюють даний метод покращення процесу очистки білків, синтезованих бактеріальними продуцентами з використанням полікатіонних флокулянтів/полімерів, наведені

30 Даний спосіб очистки білків не обмежується тільки на приклади очистки білків, що наведені в огляді, а може поширюватися на інші білки, які поширені в світі.

Приклад №1. Рефолдований попередник інсуліна гларгін.

Стадії які передують етапу Селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами

35 Етап 1. Ферментація.

Етап 2. Сепарація біомаси (клітин).

Охолоджену до температури $+10\pm 3^{\circ}\text{C}$ біомасу сепарують при 12000 об/хв

Етап 3. Руйнування (дезінтеграція) клітин на гомогенізаторі при тиску 20000 psi і температурі $+8\pm 4^{\circ}\text{C}$, 3 цикли.

40 Етап 4. Сепарація тілець включення.

Охолоджену до температури $+10\pm 3^{\circ}\text{C}$ суспензію гомогенату клітин сепарують при 12000 об/хв.

Етап 5 Відмивка тілець включень в розчині з неіоногенною поверхнево-активною речовиною.

Етап 6. Рефолдинг цільового білка.

45 Етап 7. Ферментоліз.

Наступний етап 8 Селективна флокуляція/освітлення.

Детальний опис етапу 8. Селективна флокуляція/освітлення.

1) В розчині/суспензії доводиться рН до $8,25\pm 0,25$ при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

2) В розчин/суспензію при перемішуванні поступово додається водний розчин + 1% mPAA до кінцевої концентрації mPAA в розчині 0,1%.

3) Після додавання перемішувати ще 5 ± 2 хв при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

4) До цільового розчину/суспензії з флокулюючим агентом додається розчин $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ рН $8,25\pm 0,25$ до кінцевої концентрації цільового розчину 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$. (Не обов'язкова стадія – її можна виключити).

55 5) Після додавання перемішувати ще 5 ± 2 хв при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$ і вимкнути мішалку.

6) Розчин відстоюється 2 ± 1 години при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

7) Осад, що утворився видалити з розчину можна двома методами:

а) Метод №1: надосад фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм; осад центрифугується при 12500 ± 2500 g, 10 хв., $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$. Фугат фільтрується через капсульний

60 фільтр 0,22 мкм;

б) Метод №2: в розчин з осадом додають кізельгур і при постійному перемішуванні суспензія фільтрується через наливний прес-фільтр з кізельгуром на фільтрокартоні. Потім фільтрат фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм.

Після етапу селективна флокуляція слідує ряд хроматографічних очисток ІЕС та RP-HPLC.

Далі, наведено графік «Залежність зміни концентрації цільового білку рефолдований попередник інсуліну гларгін і загального білку від значення рН в надосаді (фугаті)», наведений на Фіг. 1.1. В пробірках з розчином рефолдованого білка рН 10,35 додавався Clarisolve mPAA до концентрації 0,1% і суспензія перемішувалась при температурі 20°C. Потім в пробірках доводилося рН 10,5, 10,0 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0. Зміна об'єму розчину при доведенні рН враховувалася. Графік показує, що коли змінюється загальний заряд білка через зміну рН середовища, то змінюється його спорідненість до полікатіонного флокулюючого агента.

Далі, наведено графік «Залежність зміни чистоти і виходу цільового білку рефолдований попередник інсуліну гларгін від значення рН в надосаді (фугаті)» наведений на Фіг. 1.2. В пробірках з розчином рефолдованого білка рН 10,35 додавався Clarisolve mPAA до концентрації 0,1% і перемішувалось при температурі 20°C. Потім в пробірках доводилося рН 10,5, 10,0 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0. Зміна об'єму розчину при доведенні рН враховувалася. Цей графік ілюструє, що при належно налаштованих умовах, в даному випадку, при певному значенні рН середовища, можна відокремити нецільовий білок шляхом осадження за допомогою полікатіонного флокулюючого агента, залишаючи при цьому розчинним цільовий білок у розчині.

Різна концентрація флокулюючого агента та різна іонна сила, що спричинена присутністю тих чи інших іонів в розчині, чинить вплив на селективність та ефективність флокуляції. Також, додавання різних концентрацій фосфатів при ініціації флокуляції полікатіонами полімерами mPAA, чинить вплив на селективність та ефективність флокуляції. Тому, при розробці методики очистки, для кожного цільового білку чи короткого пептиду треба підбирати окремі індивідуальні умови.

Ефективність вибіркової флокуляції/освітлення в технології напрацювання інсуліну гларгін представлена на електрофореграмі Фіг. 3. Електрофореграма демонструє ефективність осадження клітинного бруду і нецільового білку з використанням полімеру/флокулянта Clarisolve mPAA без фосфатів після стадії Рефолдинг РПІГ. Після флокуляції слідує наступний етап катіонообмінне хроматографічне розділення (CIEC, Eshmuno S)». Електрофорез зроблений з використанням В-Ме. Доріжки 1 та 2 – це проба Розчин РПІГ (стадія Рефолдинг); доріжка 3 – це проба РПІГ + mPAA (стадія Флокуляція/освітлення); доріжки 4 та 5 – це 0-точка для CIEC, Eshmuno S, (розчин був профільований через стерилізуючи фільтр 0,22 мкм); доріжки 6 та 7 – це проба Цільова фракція CIEC, Eshmuno S; доріжка 8 – це проба Проскок CIEC, Eshmuno S; доріжка 9 – це проба Промивка A2 CIEC, Eshmuno S; доріжка 10 – це проба Градієнт перед елюцією цільової фракції CIEC, Eshmuno S. Електрофореграма демонструє, що полікатіонний полімер/флокулянт осаджує більшість нецільових білків.

В таблиці 1 наведені дані, які характеризують етап осадження клітинного бруду і нецільового білку з використанням полімеру/флокулянта Clarisolve mPAA без фосфатів після стадії Рефолдинг РПІГ. Наступний етап катіонообмінне хроматографічне розділення (CIEC, Eshmuno S).

Таблиця 1.1

Зразок	РПІГ (хроматографічний аналіз)		Загальний білок (метод Бредфорда)		Чистота РПІГ, %	Вихід РПІГ, %
	Конц., мг/мл	Маса, мг	Концентр ., мг/мл	Маса, мг		
1.1. Розчин РПІГ (Ст. Рефолдинг)	0,15	525,0	0,966	3381,00	15,53	-
1.2. РПІГ + mPAA (Ст. Флокуляція, 2h, +20°C)	0,117	409,9	0,183	641,10	63,94	78,0
1.3. 0-точка для CIEC, Eshmuno S (фільтрат 0,22 мкм)	0,113	414,7	0,166	609,22	68,07	79,0

Таблиця 1.1

Зразок	РПІГ (хроматографічний аналіз)		Загальний білок (метод Бредфорда)		Чистота РПІГ, %	Вихід РПІГ, %
	Конц., мг/мл	Маса, мг	Концентр ., мг/мл	Маса, мг		
1.4. Проскок CIEC, Eshmuno S	0	0	-	-	-	-
1.5. Цільова фракція CIEC (Елюат CIEC, Eshmuno S)	6,698	421,97	8,667	546,02	77,28	80,38

Приклад №2. Інтерферон альфа 2б (UniProt Q86UP4).

Стадії які передують етапу - Селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами:

5 Етап 1. Ферментація.

Етап 2. Сепарація біомаси (клітин).

Охолоджену до температури $+10\pm 3^{\circ}\text{C}$ біомасу сепарують при 12000 об/хв

Етап 3. Руйнування (дезінтеграція) клітин на гомогенізаторі при тиску 20000 psi і температурі $+8\pm 4^{\circ}\text{C}$, 3 цикли.

10 Етап 4. Сепарація тілець включення.

Охолоджену до температури $+10\pm 3^{\circ}\text{C}$ суспензію гомогенату клітин сепарують при 12000 об/хв.

Етап 5 Відмивка тілець включень в розчині з неіоногенною поверхнево-активною речовиною.

Етап 6. Рефолдинг цільового білка.

15 Етап 7. Ультрафільтрація.

Ультрафільтрація проводиться при тиску 0,8-1,2 Бар і температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$ через мембрани з розміром пор 5 kDa. Для розведення використовується Трисовий буф. розчин + 125 ± 20 mM NaCl pH 8,5.

20 Наступний етап 8 - Селективна флокуляція/освітлення. Детальний опис етапу 8. Селективна флокуляція/освітлення.

1) В розчині/суспензії доводиться значення pH до $8,75\pm 0,25$ при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

2) В розчин/суспензію при перемішуванні поступово додається водний розчин 125 ± 20 mM NaCl + 1% mPAA до кінцевої концентрації mPAA в розчині 0,1%.

3) Після додавання перемішувати ще 5 ± 2 хв при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$ і вимкнути мішалку.

25 4) Розчин відстоюється 2 ± 1 години при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

5) Осад, що утворився видалити з розчину можна двома методами:

а) Метод № 1: надосад фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм; осад центрифугується при 12500 ± 2500 g, 10 хв., $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$. Фугат фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм;

30 б) Метод № 2: в розчин з осадом додають кізельгур і при постійному перемішуванні фільтрується через наливний прес-фільтр з кізельгуром на фільтрокартоні. Потім фільтрат фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм.

Після етапу селективна флокуляція слідує UF та ряд хроматографічних очисток IEC, HIC та RP-HPLC.

35 Приклад № 3. SUMO-Інтерферон альфа 2б.

Стадії які передують етапу - Селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами:

Етап 1. Ферментація.

Етап 2. Сепарація біомаси (клітин).

40 Етап 3. Руйнування (дезінтеграція) клітин на гомогенізаторі.

Етап 4. Сепарація тілець включення.

Етап 5. Рефолдинг цільового білка.

Етап 6. Ферментоліз.

45 Наступний етап 7 - Селективна флокуляція/освітлення. Детальний опис етапу 7. Селективна флокуляція/освітлення.

1) В розчині доводиться pH до $8,5\pm 0,25$ при температурі $+20\pm 5^{\circ}\text{C}$.

2) В розчин при перемішуванні поступово додається водний розчин + 1% mPAA до кінцевої концентрації mPAA в розчині 0,1%.

3) Після додавання перемішувати ще 5 ± 2 хв.

4) Потім, до цільового розчину з флокулюючим агентом додається розчин $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ pH 8,25±0,25 до кінцевої концентрації цільового розчину 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ (Не обов'язкова стадія – її можна виключити).

5) Після додавання перемішувати ще 5±2 хв і вимкнути мішалку (при умові, якщо крок 4 присутній в методі).

6) Розчин відстоюється 2±1 години при температурі +20±5°C.

7) Осад, що утворився видалити з розчину можна двома методами:

а) Метод № 1: надосад фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм; осад центрифугується при 12500±2500 g, 10 хв., +20±5°C. Фугат фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм;

б) Метод №2: в розчин з осадом додають кізельгур і при постійному перемішуванні фільтрується через намівний прес-фільтр з кізельгуром на фільтрокартоні. Потім фільтрат фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм.

Після етапу селективна флокуляція слідує ряд хроматографічних очисток IEC, HIC та RP-HPLC.

Підтвердження етапів методики наведена на графіках – Фіг. 4, Фіг. 5.

На фіг. 4 представлено графік «Залежність зміни чистоти і виходу цільового білку IFN alpha 2b в надосаді (фугаті) від pH. Розчин IFN alpha 2b + 0.1 % mPAA (2 години). Графік будувався відносно методу по Бредфорду». Цей графік ілюструє, що при належно налаштованих умовах, в даному випадку, при певному значенні pH середовища, можна відокремити нецільовий білок шляхом осадження за допомогою полікатіонного флокулюючого агента, залишаючи при цьому розчинним цільовий білок у розчині.

На фіг. 5 представлено графік «Залежність зміни концентрації цільового і загального білку в надосаді (фугаті) від pH. Розчин IFN alpha 2b + 0.1 % mPAA (2 години). Графік показує, що коли змінюється загальний заряд білка через зміну pH середовища, то змінюється його спорідненість до полікатіонного флокулюючого агента.

Різна концентрація флокулюючого агента та різна іонна сила, що спричинена присутністю тих чи інших іонів в розчині, чинить вплив на селективність та ефективність флокуляції. Також, додавання різних концентрацій фосфатів при ініціації флокуляції полікатіонами полімерами mPAA, чинить вплив на селективність та ефективність флокуляції. Тому, при розробці методики очистки, для кожного цільового білку чи короткого пептиду треба підбирати окремі індивідуальні умови.

Метод селективної флокуляції використовували для очищення ензимів. Був розроблений метод для освітлення клітинних гомогенатів при отриманні ензимів гідроксистероїддегідрогеназ за допомогою полікатіонних полімерів/флокулянтів. Видаляли осад методом DE-фільтрації і/або центрифугуванням. Застосовували полімери/флокулянти Clarisolve mPAA і Clarisolve pDADMAC. Результати дослідження за винаходом наведено в наступних прикладах (Приклад №4).

Приклад №4. Ензими HSDH.

Стадії які передують етапу - селективна флокуляція полікатіонними полімерами/флокулянтами

Етап 1. Ферментація.

Етап 2. Сепарація біомаси (клітин).

Охолоджену до температури +10±3°C біомасу сепарують при 12000 об/хв.

Етап 3. Руйнування (дезінтеграція) клітин на гомогенізаторі.

Охолоджені до температури +8±4°C суспендовані клітини у буферному розчині гомогенізують на дезінтеграторі при тиску 20000 psi і температурі +8±4°C, 3 цикли.

Рекомендується використовувати один з представлених буферних розчинів:

а) Метод №1: 20±5 mM Трис + 125±25 mM NaCl pH 8,0±0,25;

б) Метод №2: 50±20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ + 125±25 mM NaCl pH 8,0±0,25;

Наступний етап 4 Селективна флокуляція/освітлення.

Детальний опис етапу 4. Селективна флокуляція/освітлення.

1) Показник pH суспензії має бути 8,0±0,25.

2) В суспензію при помірному перемішуванні поступово додається 10% розчин pDADMAC до кінцевої концентрації pDADMAC в розчині 0,2%. Температура розчину +6±4°C.

3) Після додавання перемішувати ще 5±2 хв при температурі +6±4°C і вимкнути мішалку.

4) Розчин відстоюється 2±1 години при температурі +6±4°C.

5) Осад, що утворився видалити з розчину/суспензії можна двома методами:

а) Метод №1: надосад фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм; осад центрифугується при 12500 ± 2500 g, 10 хв., $+6 \pm 4^\circ\text{C}$. Фугат фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм;

б) Метод №2: в розчин/суспензію з осадом додають кізельгур і при постійному перемішуванні фільтрується через наливний прес-фільтр з кізельгуром на фільтрокартоні. Потім фільтрат фільтрується через капсульний фільтр 0,22 мкм.

Після етапу селективна флокуляція слідує іммобілізована металоафінна хроматографія та ультрафільтрація.

В результаті наведених етапів були отримані наступні технічні результати:

10 - значне зменшення каламутності (дивись Фіг. 6 – наведено графік «Визначення мутності спектрофотометричним методом», довжина хвилі 840 нм) та покращення фільтрації (Табл. 2.) після обробки флокулюючими агентами.

15 - втрата ефективності хроматографічної колонки на етапі очищення для необробленого гомогенату, що призводить до зменшення виходу цільового білка та втрати чистоти – обробка полікатіонними полімерами/флокулянти вирішує проблему. Залучення методу селективної флокуляції в технологію напрацювання цільового білку повністю вирішила проблему пробопідготовки для першого хроматографічного розділення.

20 - відсутність шкоди ефективності хроматографічної колонки після 10 циклів хроматографічного очищення з використанням гомогенату, обробленого полікатіонними агентами. (При використанні технології напрацювання ензимів HSDHs без обробки флокулюючими агентами гомогенат не відповідає критеріям підготовленого розчину для подальшого хроматографічного розділення. Це призводить до втрати ефективності колонки через 1-3 цикли очищення).

25 - немає значної втрати цільового білка нижче критичної концентрації полікатіонних полімерів/флокулянтів (потрібно визначати експериментально в кожному окремому випадку) (Фіг. 7 – представлено графік «Вихід цільового ензиму гідроксистероїддегідрогенази в залежності від концентрації Clarisolve pDADMAC в гомогенаті визначений за допомогою SDS-PAGE». Для обчислення використовувався Total Lab).

30 - більш ніж 4 lg зменшення hcDNA (Фіг. 8 – представлено графік «Визначення ДНК клітин-хазяїна». Вміст ДНК визначали за допомогою флуоресцентного фарбування нуклеїнової кислоти Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay kit (Life technology, Waltham, MA, USA). На графіку показано, що полікатіонні полімери/флокулянти зменшують концентрацію ДНК клітин-хазяїна в розчині).

35 - зменшення ендотоксину більше ніж на 6 lg (Фіг. 9 – представлено графік «Визначення ендотоксинів». Визначення рівня ендотоксинів проводили з використанням комерційного набору ENDOLISA® (bioMérieux, Франція). На графіку показано, що полікатіонні полімери/флокулянти зменшують концентрацію ендотоксинів у розчині).

40 - зменшує кількість білку клітин-хазяїна в розчині (Фіг. 10 – представлено графік «Визначення загального білку методом Лоурі». На графіку показано, що полікатіонні полімери/флокулянти зменшують концентрацію білку клітин-хазяїна у розчині).

- найбільш задовільні результати досягнуті при концентраціях: 0,1 % pDADMAC і при 0,05 % pDADMAC + 1,0 % mPAA.

- отримали відтворювані результати в різних серіях ферментацій з декількома цільовими білками (ензимами) при різних концентраціях, рН, буферних композиціях, провідності.

45 - при напрацюванні ензимів гідроксистероїддегідрогеназ, тільки після використання полікатіонних полімерів/флокулянтів технологічний процес став можливим, так як розчин після центрифугування (без флокуляції/освітлення) не відповідав критеріям підготовленого розчину для подальшого хроматографічного розділення (був каламутний).

50 Результати покращення фільтрації розчинів/суспензій, котрі були оброблені полікатіонними флокулюючими агентами наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Концентрація флокулянта pDADMAC	Тип фільтруючого елементу	Вхідний тиск, бар	Середнє значення фільтруючої проникності (Flux), л/м²/год	Ефективне навантаження фільтруючого елементу, л/м²
0,00%	MCE фільтр, 0.5 мкм	2,5	289	58
0,05%	MCE фільтр, 0.5 мкм	0,6	1926	356
0,10%	MCE фільтр, 0.5 мкм	0,6	2173	432
0,20%	MCE фільтр, 0.5 мкм	0,6	2408	483

Переваги заявленого методу на покращення процесу очистки білків, синтезованих бактеріальними продуцентами з використанням полікатіонних флокулянтів надаються в таблиці 3.

5

Таблиця 3

Продукт і технологічний процес	Сорбенти для хроматографічного розділення	Витрати на реактиви, роботу і час
1. Не потрібно перепакувати хроматографічну колону перед кожним новим хроматографічним розділенням. 2. Після етапу флокуляції /освітлення можливо отримати розчин цільового білка чистіше, ніж після трьох етапів хроматографії¹. 3. Метод дозволяє позбавитися декількох етапів (хроматографічних очищень)¹. 4. Технологічний процес став простішим. 5. Даний метод полегшує процес фільтрації/центрифугування. В багатьох випадках метод дозволяє проводити відстоювання, що помітно пришвидшує і полегшує технічний процес. 6. При напрацюванні деяких білків, наприклад, ензимів гідроксистероїддегідрогеназ, тільки після використання полікатіонних полімерів/флокулянтів технологічний процес може бути можливим, так як розчин після центрифугування (без флокуляції/освітлення) часто може не відповідати критеріям підготовленого розчину для подальшого хроматографічного розділення² (буде каламутний).	1. Потрібно менше реактивів та часу для регенерації сорбенту. 2. Зберігаються сорбенти та збільшується термін їхньої служби. Також, збільшується термін служби хроматографічних колон. 3. Можна зменшити об'єм сорбенту в колоні (особливо на етапі першого хроматографічного розділення), оскільки, нецільових макромолекул у розчині буде менше, то і сорбційне навантаження на колону буде менше¹. 4. Для технології потрібно менше видів сорбенту, оскільки в технологічному процесі зменшиться кількість етапів хроматографічних очищень¹. 5. Немає втрат сорбенту при перепакуванні колони перед кожним хроматографічним розділенням, оскільки перепакування колони перед хроматографічним очищенням не потрібне.	1. Для етапу освітлення/флокуляції потрібно дуже мало полімеру/флокулянту, зазвичай концентрація становить від 0,01% до 1%. 2. Зменшуються витрати на сорбенти, реактиви та роботу. 3. Зменшуються втрати цільового білка, оскільки краща якість підготовки розчину для нанесення і собівартість кінцевого продукту теж зменшується. 4. Скорочується час технологічного процесу. А час – це також гроші. 5. Технологія біотехнологічного напрацювання цільових продуктів з використанням полікатіонних флокулянтів зменшує собівартість кінцевого продукту.

Примітка:

1. – При порівнянні напрацювань інсуліну гларгін без використання полімеру/флокулянту та з використанням полімеру/флокулянту Clarisolve mPAA.

2. – При порівнянні напрацювань ензимів HSDH для ферментативного синтезу урсодезоксихолевої кислоти без використання полімеру/флокулянту та з використанням полімеру/флокулянту Clarisolve pDADMAC.

10

У винаході, що заявляється, в напрацюванні біотехнологічних АФІ, полікатіонні флокуючі агенти являються дуже перспективними в промисловій і фармацевтичній біотехнології. Полікатіонні полімери/флокулянти показали високу ефективність в осадженні клітинного сміття продуцента (муреїн, ліпополісахариди, нуклеїнові кислоти та білки клітин-хазяїна) і білкових агломератів цільового білка та освітленні клітинних гомогенатів і розчинів цільового білка після етапів: гомогенація клітин-продуцента, рефолдинг цільового білка і ферментоліз.

Заявлений метод вибіркової флокуляції/освітлення з використанням полікатіонних полімерів/флокулянтів у експериментах з інсуліном гларгін, інтерфероном $\alpha 2b$ та напрацюванні ферментів показав високу ефективність. Дані полімери/флокулянти не тільки осаджують частки, але також утворюють іонні зв'язки з негативно зарядженими цільовими молекулами – осаджують їх. Полікатіонний полімер/флокулянт працює подібно до аніонообмінної хроматографії, але іонообмінне розділення йде не на нерухомій фазі (на сорбенті), а в рідкій фазі (в розчині). І на відміну від аніонообмінної хроматографії має низку технологічних переваг, і є економічно вигідним методом.

Полікатіонний полімер/флокулянт, при створенні оптимальних умов, здатний осаджувати клітини, клітинні білки, нуклеїнові кислоти, муреїн і ліпополісахариди, при цьому, цільовий білок залишається розчинним у розчині. Даним методом можна очистити від клітинного сміття розчин/суспензію будь-якого розчинного білка (інтерферони та інші цитокіни; FGFs та інші фактори росту; соматотропін, інсуліни та інші природні та штучні білкові гормони та гормоподібні речовини; всі класи імуноглобулінів, та міметики антитіл; всі класи природніх та штучних ензимів (EC1, EC2, EC3, EC4, EC5, EC6, EC7), наприклад, кех-протеази, або HSDH; агоністи рецепторів глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1) та будь-які агоністи, антагоністи, або інгібітори білкової природи, чи короткі пептиди, тощо) та отримати розчин високої чистоти.

Для етапу освітлення/флокуляції потрібно дуже мало полімеру/флокулянту, зазвичай концентрація становить від 0,01% до 1%. В залежності від природи білка, середовища та полікатіонного полімеру/флокулянту даний метод можна проводити у великих межах рН (від 3,0 до 10,5), у великих межах значення іонної сили (до 1 M NaCl в деяких випадках навіть більше; також, допускається використання інших нейтральних солей) і в досить великих температурних межах (від +1° до +40° C). Верхня межа температури лімітується термічною денатурацією цільового білка. Якщо цільовий білок стійкий до термічної денатурації, то температурні межі можуть бути підняті.

В залежності від природи білка, середовища та полікатіонного полімеру/флокулянту даний метод може працювати в різноманітних буферних системах.

В залежності від цільової молекули, умов середовища та полікатіонного полімеру/флокулянту, в методі для корекції флокуляції/освітлення допускається використовувати лужноземельні метали (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+}) та Zn^{2+} .

В залежності від цільової молекули, умов середовища та полікатіонного полімеру/флокулянту, допускається проводити селективну флокуляцію в присутності цвітер-іонів. Наприклад, амінокислот: Arg, Gly, Cys. Дана особливість може бути цінна при створенні методу селективної флокуляції після етапу Рефолдинг білку.

В залежності від цільової молекули, умов середовища та полікатіонного полімеру/флокулянту, допускається проводити селективну флокуляцію в присутності речовин, що сприяють фолдингу білка, таких як: Arg, гліцинаміл, циклодекстрини, гліцерин та інші. Дана особливість може бути цінна при створенні методу селективної флокуляції після етапу Рефолдинг білку.

Допускається проведення методу селективної флокуляції в присутності речовин, що використовуються для екранування амінокислот при ферментолізі, таких як, цитраконовий ангідрид. Дана особливість може бути цінна при створенні методу селективної флокуляції після етапу Ферментоліз цільової молекули.

В залежності від цільової молекули, умов середовища та полікатіонного полімеру/флокулянту, допускається проводити селективну флокуляцію в присутності хелатуючих речовин, таких як: EDTA, щавлева та лимонна кислота. Дана особливість може бути цінна при створенні методу селективної флокуляції після етапів: Гомогенізація, Рефолдинг білку та Ферментоліз цільової молекули.

В залежності від цільової молекули, умов середовища та полікатіонного полімеру/флокулянту, допускається проводити селективну флокуляцію в присутності окисно-відновних пар, таких як: GSH/GSSG, чи Cys/Цистин та інші. Дана особливість може бути цінна при створенні методу селективної флокуляції після етапу Рефолдинг білку.

В залежності від природи білка, середовища та полікатіонного полімеру/флокулянту, даний метод потребує швидко освітлює і осаджує клітинний бруд. Зазвичай достатньо від 10 хв до 2 годин експозиції для якісного освітлення/флокуляції.

Даний метод полегшує процес фільтрації/центрифугування. В багатьох випадках метод дозволяє проводити відстоювання, що помітно пришвидшує і полегшує технічний процес. Методом вибіркової флокуляції/освітлення, також, можливо згладити наслідки другої, не менш важливої проблеми сучасної біотехнології – рефолдинг цільового білка з тілець включення. На шляху згортання глобули білка, який йде в напрямку пошуку енергетичного мінімуму для системи "білок-розчинник", можливі енергетичні пастки – досить глибокі мінімуми, з яких неможливо вибратися, оскільки глибина такої локальної ями перевищує енергію теплових флуктуацій [26].

Технологія вибіркової флокуляції/освітлення для деяких глобулярних білків, за умов, якщо працювати з полікатіонними полімерами/флокулянтами в межах значень рН, котрі будуть вищі ізоелектричної точки цільового білка, дозволяє зменшити присутність, або навіть позбутися від агрегатів цільового білка в розчині. Так як, при зростанні ланцюга/ланцюгів у білковому агрегаті, незважаючи від природи міжмолекулярного зв'язку (S-S місток, чи гідрофобні взаємодії) загальний від'ємний заряд комплексу починає зростати (наближається до суми зарядів всіх мономерів комплексу). При агрегації великих протеїнів з більшою амінокислотною послідовністю, котрі мають більше заряджених амінокислот зростання загального заряду більш виражене. Крім того, при олігомеризації агрегатів зменшується їх здатність до сольватації, що призводить, в кінцевому етапі, до осадоутворення. Ці особливості збільшують спорідненість агрегатів цільового білка до полікатіонного полімера/флокулянта в порівнянні з нативним мономером цільового білку, що дозволяє осадити агрегати, а нативний мономер залишити розчинним в розчині.

Даний метод піднімає на новий рівень підготовку розчину для першого етапу хроматографічного розділення (таблицю 3).

Винахід, що заявляється, а саме застосування підходу з використанням полікатіонних флокулянтів, який описаний в даному методі, призводить до: покращення процесу очистки білків, зменшення тривалості і собівартості процесу їх виробництва, зокрема:

1. Покращення виходу та фінальної чистоти цільових білків;
2. Суттєве зменшення мутності та покращення фільтрації цільового розчину;
3. Покращення відтворюваності на етапах хроматографічної очистки та значне збільшення життєвого циклу хроматографічних сорбентів;
4. Суттєве зменшення рівня ендотоксинів, ДНК та білків клітини хазяїна.

На базі АТ «Фармак» розроблена методика освітлення розчину цільового білка та флокуляції клітинного сміття продуцента *E. coli* (муреїн, ліпополісахариди, нуклеїнові кислоти та білки клітин-хазяїна) і білкових агломератів після етапу Рефолдинг і етапу Ферментоліз при напрацюванні попередника інсуліну гларгін та інтерферона альфа 2b. Особливо полімер/флокулянт Clarisolve mPAA проявляв високу селективність – чистота розчину після освітлення/флокуляції була вищою ніж після двох етапів хроматографії. Видаляли осад методом DE-фільтрації або методом центрифугування (фугат збирали).

Для технології напрацювання ферментативним шляхом урсодезоксихолевої та дезоксихолевої кислоти було розроблено метод освітлення клітинних гомогенатів за допомогою полікатіонних полімерів/флокулянтів з розчиненими цільовими ензимами (гідроксистероїддегідрогенази) в рідкій фазі. Видаляли осад методом DE-фільтрації, і/або центрифугуванням (фугат збирали).

Джерела інформації:

1. Hae-Gwang Hwang, Kwang-Jin Kim, Se-Hoon Lee, Chang-Kyu Kim, Cheol-Ki Min, Jung-Mi Yun, Su Ui Lee 6, Young-Jin Son. Recombinant Glargine Insulin Production Process Using *Escherichia coli*. J Microbiol Biotechnol. 2016 Oct 28;26(10):1781-1789. doi: 10.4014/jmb.1602.02053.

2. Гильчук П.В. Оценка методов ренатурации для промышленного получения рекомбинантных белков из телец включения *Escherichia coli* в биологически активной форме. ISSN 0233-7657. Биополимеры и клетка. 2004. Т. 20. № 3: 182-192.

3. J. Meng et al., High-yield expression, purification and characterization of tumor-targeted IFN- α 2a, Cytotherapy. 9 (1) (2007) P60–68.

4. Hiroshi Yamaguchi and Masaya Miyazaki. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. Biomolecules 2014, 4, 235-251; doi:10.3390/biom4010235.

5. Christin Pohl, Marco Polimeni, Sowmya Indrakumar, Werner Streicher, Günther H.J. Peters, Allan Nørgaard, Mikael Lund, and Pernille Harris. Electrostatics Drive Oligomerization and Aggregation of Human Interferon Alpha-2a. *The Journal of Physical Chemistry B* (2021), 125, 50, 13657–13669.

6. Clark L. A. Protein aggregation determinants from a simplified model: cooperative folders resist aggregation. *Protein science: a publication of the Protein Society* (2005), 14(3), 653–662. <https://doi.org/10.1110/ps.041017305>.

7. Yiming Li, Walter F. Stafford, Mark Hesselberg, David Hayes, Zhuchun Wu, Michael Byrne. Characterization of the self-association of human interferon- α 2b, albinterferon- α 2b, and pegasys. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volume 101, Issue 1, January 2012, Pages 68-80.

8. Naim Panjwani, Derek J. Hodgson, Simon Sauve', Yves Aubin. Assessment of the Effects of pH, Formulation and Deformulation on the Conformation of Interferon Alpha-2 by NMR. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, VOL. 99, NO. 8, AUGUST 2010. P3334-3342.

9. Thirumalai. Protein folding guides disulfide bond formation. *BIOPHYSICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY*. August 21, 2015; 112 (36) 11241-11246. <https://doi.org/10.1073/pnas.150390911>.

10. Seyed Babak Mousavi, Seyed Javad Davarpanah. Solvent extraction of recombinant interferon alpha-2b from inclusion bodies and efficient refolding at high protein concentrations. *Protein Expression and Purification*. September 2022, Volume 197.

11. Mohammad Reza Fazeli, Nima Hezarjaribi. A Simplified Process for Purification and Refolding of Recombinant Human Interferon- α 2b. *Iranian Biomedical Journal* 26 (1): January 2022. 85 -90.

12. Mohammed Shehadul Islam, Aditya Aryasomayajula, and Ponnambalam Ravi Selvaganapathy. A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines* (Basel). 2017 Mar; 8(3): 83. doi: 10.3390/mi8030083.

13. Carl A. Schnaitman. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid, Triton X-100, and Lysozyme on the Morphology and Chemical Composition of Isolated Cell Walls of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, oct 1971, P553-563.

14. Luminita Ghimici, Marieta Nichifor. Dextran derivatives application as flocculants. *Carbohydr Polym*. 2018 Jun 15;190:162-174. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.02.075. Epub 2018 Feb 24.

15. Daniel Burgstaller, Walpurga Krepper, Josselyn Haas, Marine Maszelin, Jure Mohoric, Katja Pajnic, Alois Jungbauer, Peter Satzer. Continuous cell flocculation for recombinant antibody harvesting. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*. 2018 Jul;93(7):1881-1890. doi: 10.1002/jctb.5500. Epub 2017 Dec 8.

16. Tomic S., Besnard L., Furst B., Reithmeier R., Wichmann R., Schelling P. and Hakemeyer C. Complete clarification solution for processing high-density cell culture harvests. *Sep Purif Technol* 141:269–275 (2015).

17. Clarisolve mPAA. Stimulus-responsaive polymer flocculant for use with Clarisolve 60HX depth filters. Application Note. Millipore® Preparation, separation, Filtration & Monitoring Products. MERCK.

18. Markian S. Bahniuk, Fawad Alidina, Xiaoli Tan, and Larry D. Unsworth. The last 25 years of research on bioflocculants for kaolin flocculation with recent trends and technical challenges for the future.

19. Palombarini F., Ghirga F., Boffi A., Macone A., Bonamore A. (2019). Application of crossflow ultrafiltration for scaling up the purification of a recombinant ferritin. *Protein Expr. Purif.* 163:105451. 10.1016/j.pep.2019.105451.

20. Tomic S., Besnard L., Furst B., Reithmeier R., Wichmann R., Schelling P., et al. (2015). Complete clarification solution for processing high cell culture harvests. *Separat. Purific. Technol.* 141 269–275. 10.1016/j.seppur.2014.12.002.

21. Liubov A. Osminkina, Svetlana N. Agafilushkina, Ekaterina A. Kropotkina, Nikolay Yu. Saushkin, Ivan V. Bozhev, Sergei S. Abramchuk, Jeanne V. Samsonova, Alexandra S. Gambaryan. Antiviral adsorption activity of porous silicon nanoparticles against different pathogenic human viruses. *Ke Ai Bioactive Materials*. 2022 Jan;7:39-46. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.06.001. Epub 2021 Jun 16.

22. Wenshuai Liu, Xiyang Fan, Xingang Wang, Kamal Rai, Jianhua Su, Mo Xian, Rui Nian. Chromatin-directed clarification in cell culture fluid enables non-protein affinity antibody purification by tangential flow filtration integrated with high-capacity cation exchange chromatography. *Biochemical Engineering Journal*, Volume 151, 15 November 2019, 107315. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107315>

23. Lisa D. Cabrita, Michelle K.M. Chow and Stephen P. Bottomley. A practical guide to protein expression and refolding from inclusion bodies. Protein Expression and Refolding, Cabrita and Bottomley, 2004, Biotechnology Annual Review, 10:31-50.

24. The notes from lecture 02 of Harvard's BCMP 200: Molecular Biology course, delivered by Joe Loparo on September 5, 2014.

25. George D. Rose. Reframing the Protein Folding Problem: Entropy as Organizer. Biochemistry 2021, 60, 49, 3753–3761.

26. Сиволоб А.В. Молекулярна біологія - ВПЦ "Київський університет", 2008 - 263-267.

27. Jiacheng Li, Chengyu Hou, Xiaoliang Ma, Shuai Guo, Hongchi Zhang, Liping Shi, Chenchen Liao, Bing Zheng, Lin Ye, Lin Yang and Xiaodong He. Entropy-Enthalpy Compensations Fold Proteins in Precise Ways. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 9653. <https://doi.org/10.3390/ijms22179653>.

28. Meng Qin, Wei Wang, and D. Curtis C.-J. Lin and Jui-Yoa Chang. Pathway of Oxidative Folding of Bovine α -Interferon: Predominance of Native Disulfide-Bonded Folding Intermediates. Biochemistry 2007, 46, 3925-3932.

29. A.R. Rees, M.J.E. Sternberg. FROM CELLS TO ATOMS in illustrated introduction to molecular biology. Chapter 10 Structure of globular proteins. 1984.

30. Alexandra Patriksson. From Solution into Vacuum - Structural Transitions in Proteins. Chapter 4.4. Folding, unfolding and conformational space. Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology 360. Uppsala University (Sweden) (2007) P25-26.

31. S. Walter Englander and Leland Mayne. The case for defined protein folding pathways. BIOPHYSICS AND COMPUTATIONAL BIOLOGY. (June 19, 2017) 114 (31) P8253-8258 <https://doi.org/10.1073/pnas.1706196114>.

32. Yong-Dong Liu, Gui-Feng Zhang, Jing-Jing Li, Jing Chen, Yin-JueWang, Hong Ding and Zhi-Guo Su. Identification of an oxidative refolding intermediate of recombinant consensus interferon from inclusion bodies and design of a two-stage strategy to promote correct disulfide-bond formation. Biotechnol. Appl. Biochem. (2007) 48, P189–198 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BA20070047.

33. Gupta S. K., Shukla P. (2017c). Sophisticated cloning, fermentation, and purification technologies for an enhanced therapeutic protein production: a review. Front. Pharmacol. 8:419. 10.3389/fphar.2017.00419.

34. A. J. Link, K. Robison, G. M. Church. (August 1997). "Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of Escherichia coli K-12". Electrophoresis. (8):1259-1313.

35. P. L. Dubin, J. Gao & K. Mattison. Protein Purification by Selective Phase Separation with Polyelectrolytes. SEPARATION AND PURIFICATION METHODS, 23(1), 1-16 (1994).

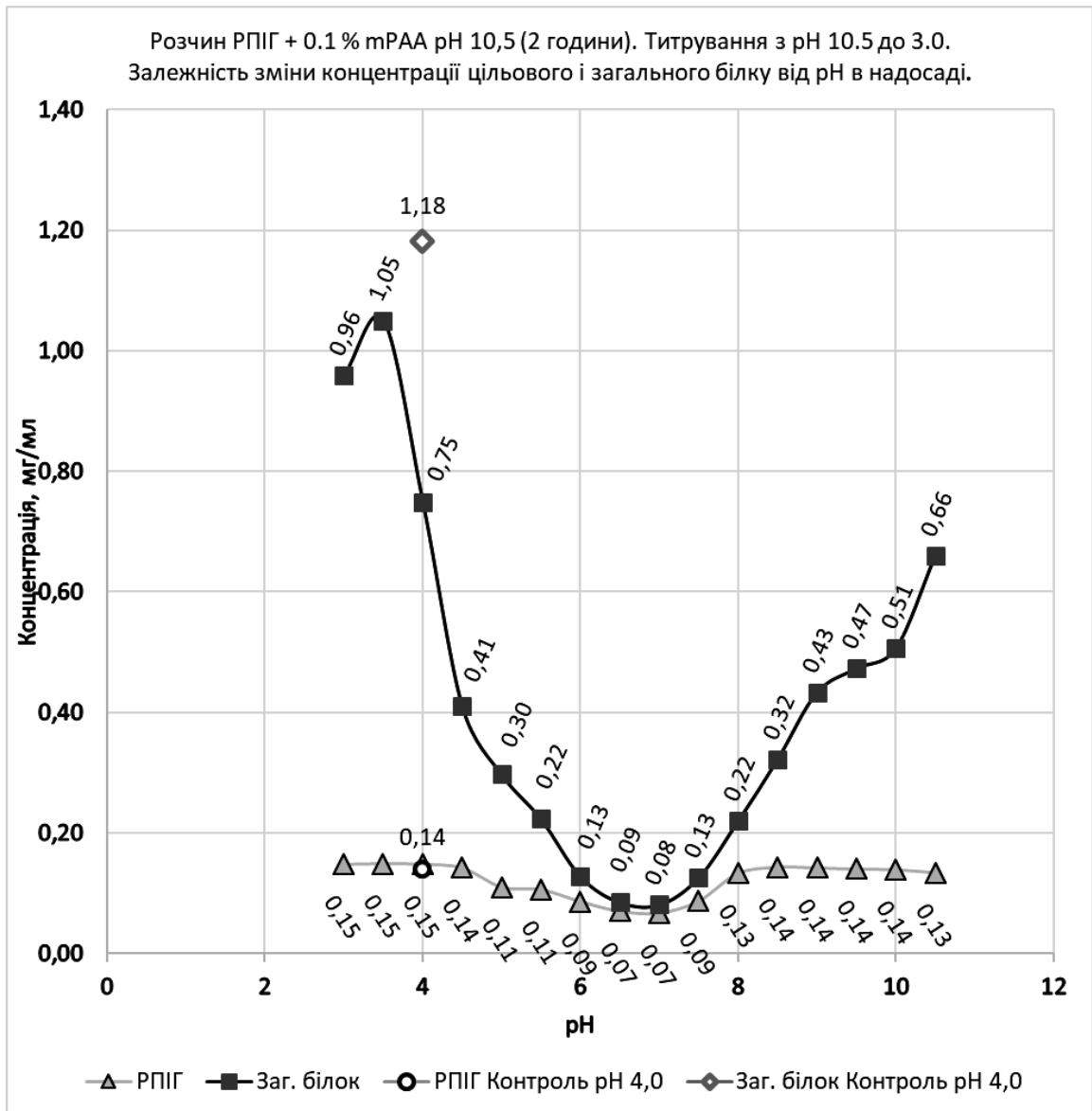
36. J. Xia; P. L. Dubin, In Macromolecular Complexes in Chemistry und Biology, P. L.Dubin; J. Bock; R. M. Davis; D. Schultz; and C. Thies, Eds. Springer-Verlag, Berlin, 1994; Chapter 15.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

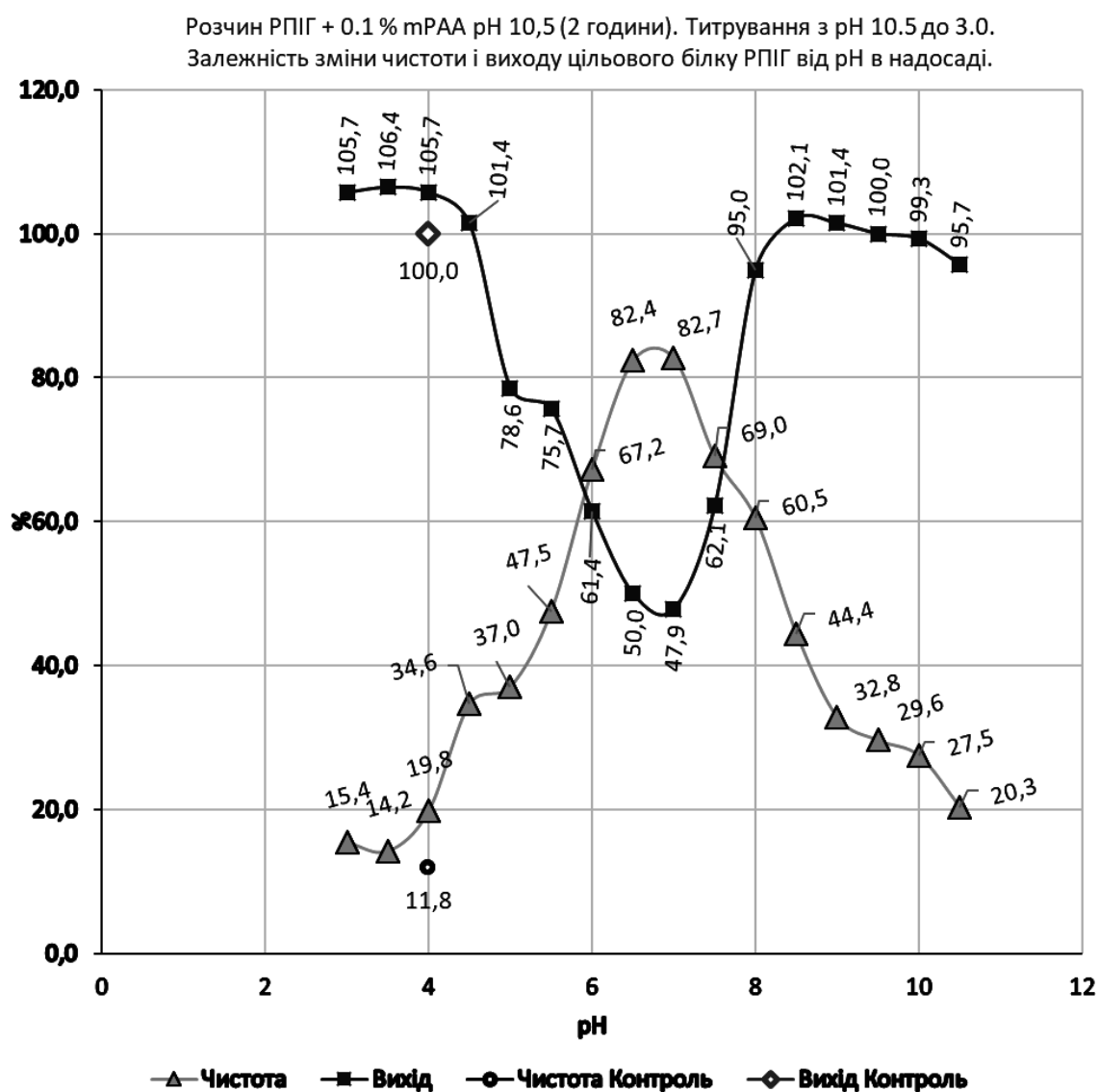
40

Спосіб покращення процесу очистки білків, синтезованих бактеріальними продуцентами з використанням полікатіонних флокулянтів, який **відрізняється** тим, що полікатіонні флокулянти додають на одній зі стадій виділення та очистки, вибраній з групи: до суспензії гомогенату бактеріальної культури - для цільового білка, синтезованого у нативній розчинній формі; до розчину рефолдованого білка - для цільового білка, синтезованого у ненативній формі у вигляді тілець включень; до розчину або суспензії після етапу ферментолізу - для цільового білка, технологія отримання якого включає ферментоліз цільової молекули або її попередника.

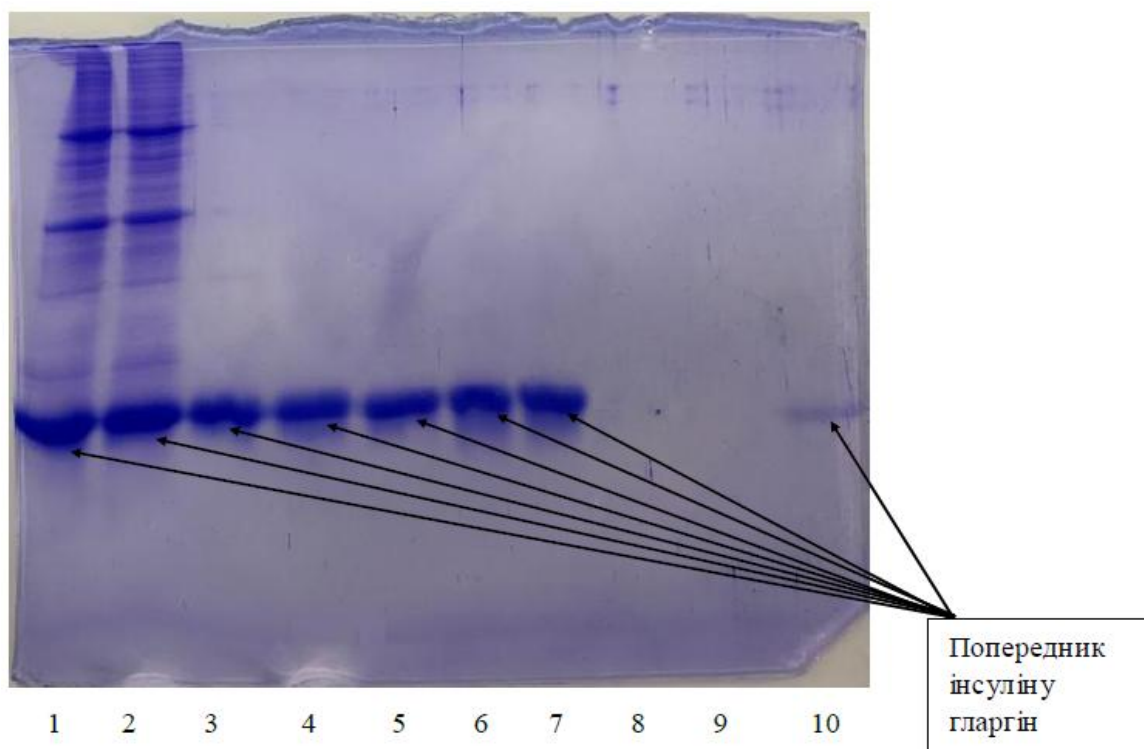
45



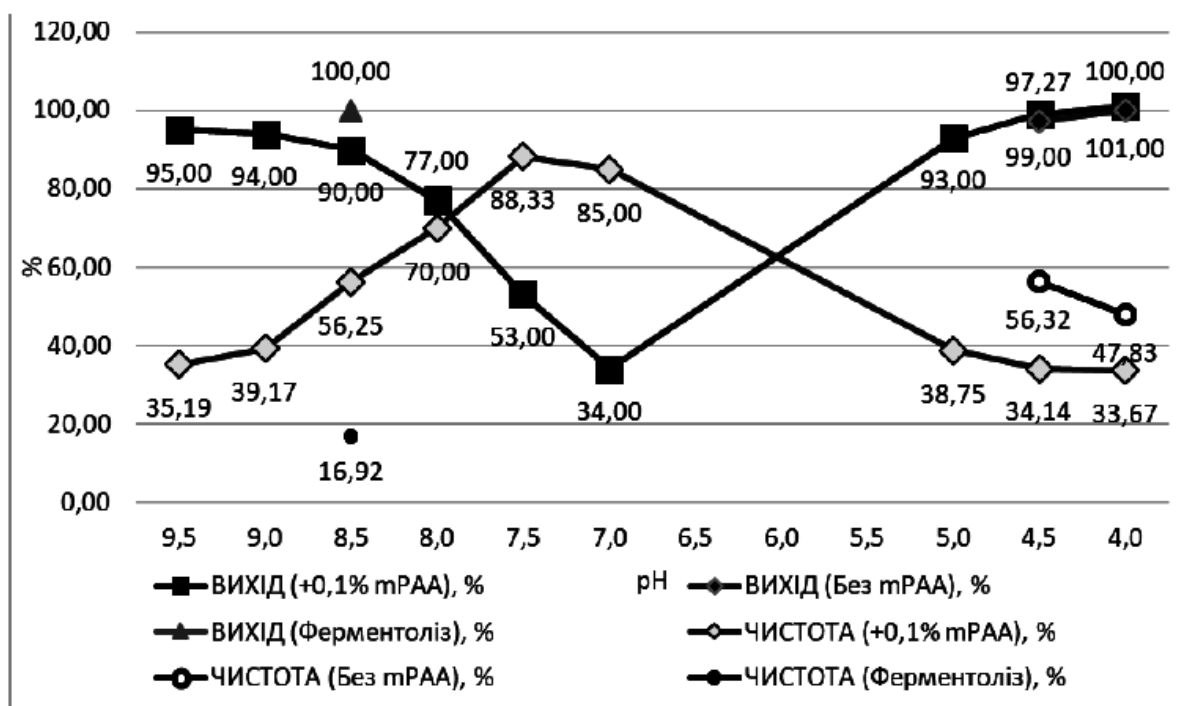
Фіг. 1. Графік «Залежність зміни концентрації цільового білку рефолдований попередник інсуліну гларгін і загального білку від значення pH в надосаді (фугаті)»



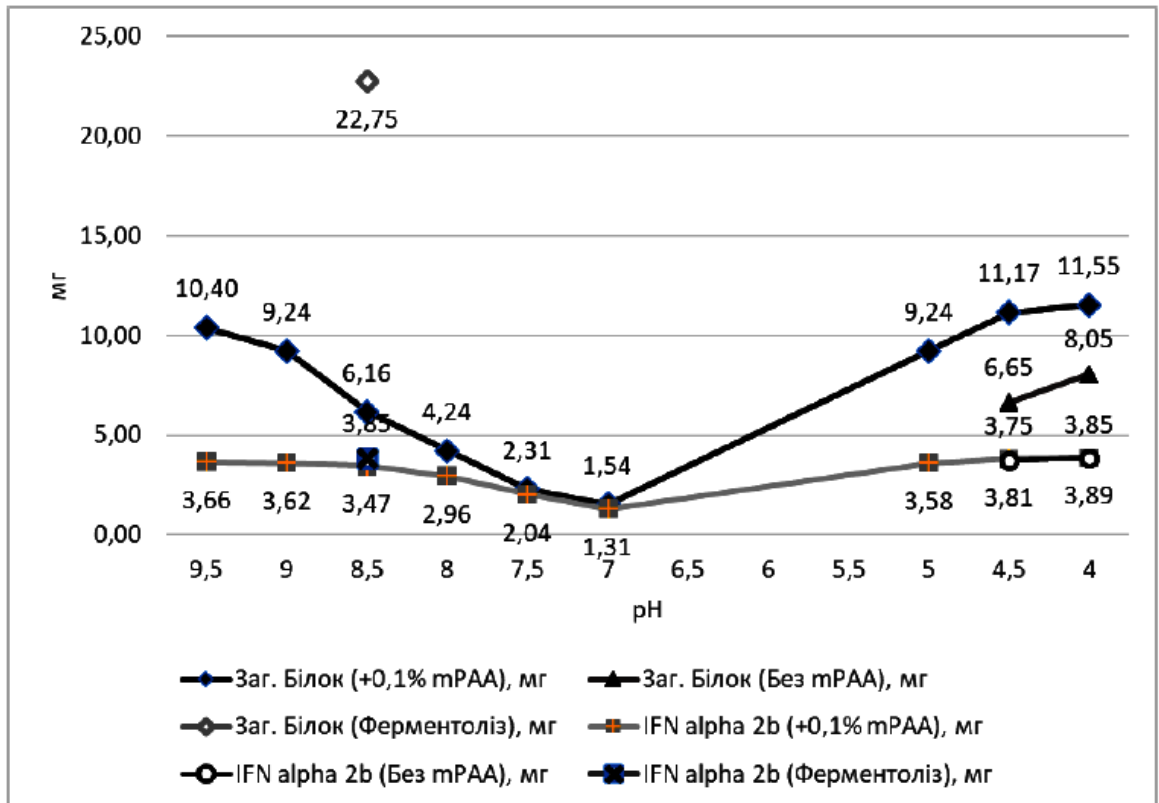
Фіг. 2. Графік «Залежність зміни чистоти і виходу цільового білку рефолдований попередник інсуліну гларгін від значення pH в надосаді (фугаті)»



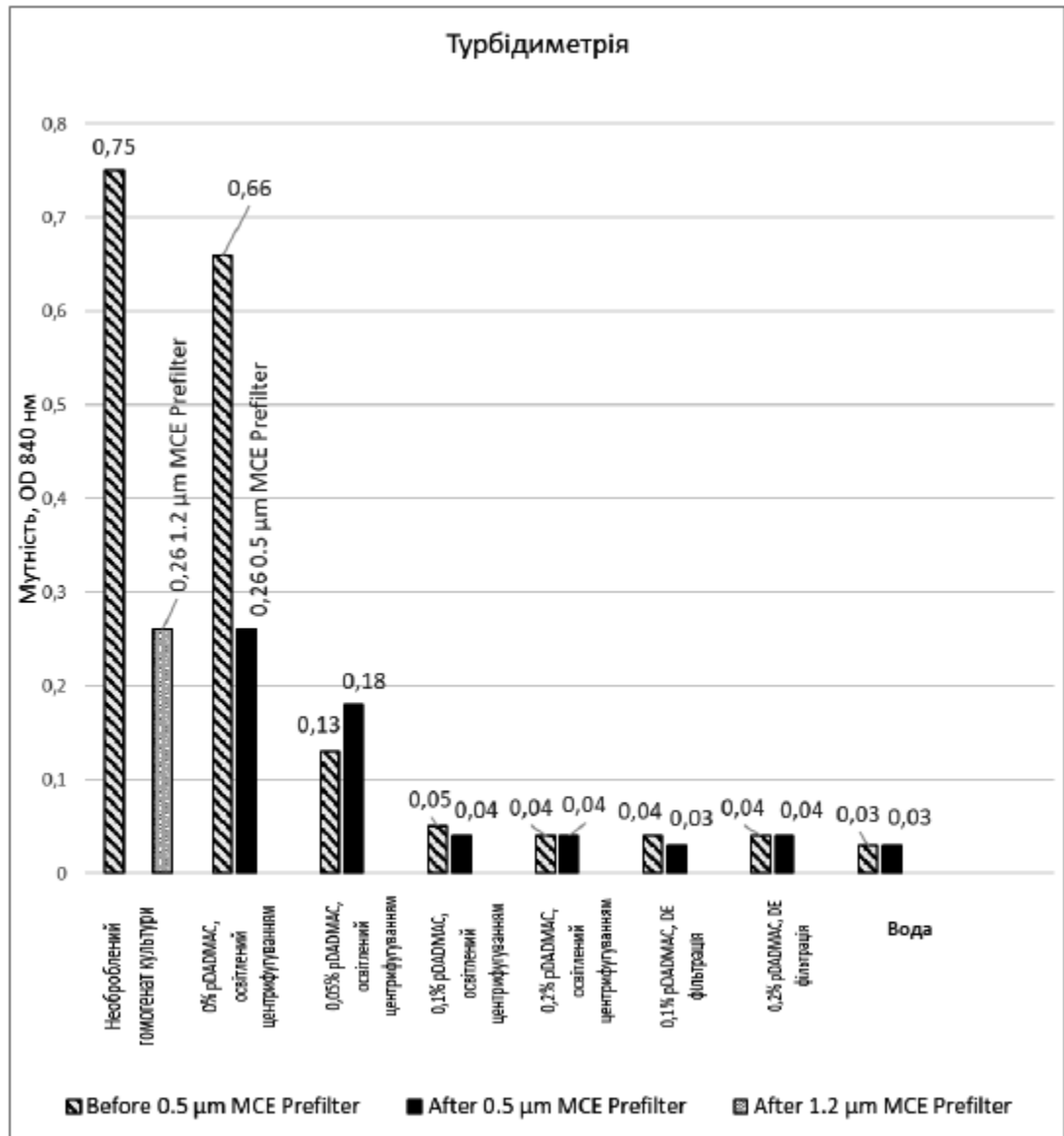
Фіг. 3. Електрофореграма «Осадження клітинного бруду і нецільового білку з використанням полімеру/флокулянта Clarisolve mPAA без фосфатів після стадії Рефолдинг РПІГ». Електрофорез зроблений з використанням В-Ме.



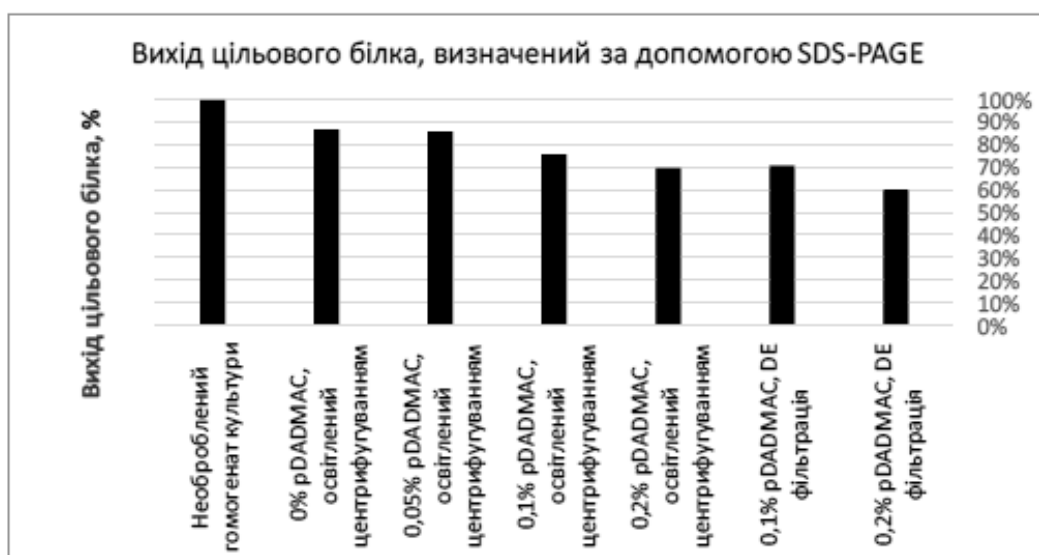
Фіг. 4. Графік «Залежність зміни чистоти і виходу цільового білку IFN alpha 2b в надосаді (фугаті) від pH. Розчин IFN alpha 2b + 0.1 % mPAA (2 години)»



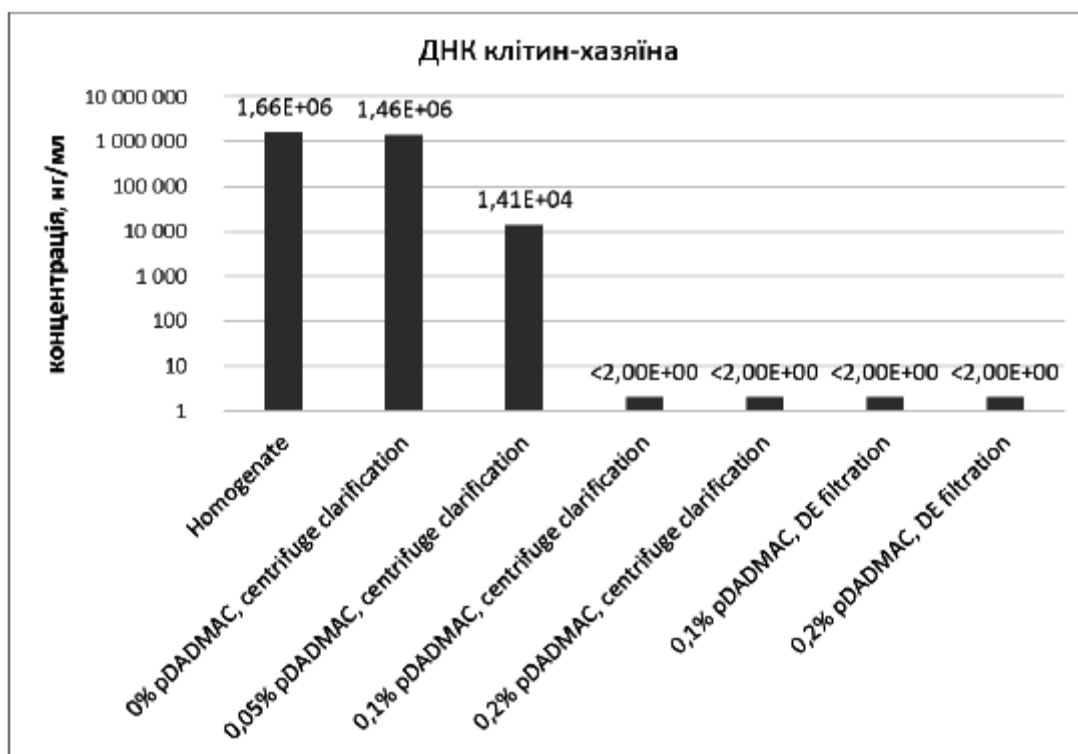
Фіг. 5. Графік «Залежність зміни концентрації цільового і загального білку в надосаді (фугаті) від рН. Розчин IFN alpha 2b + 0.1 % mPAA (2 години)»



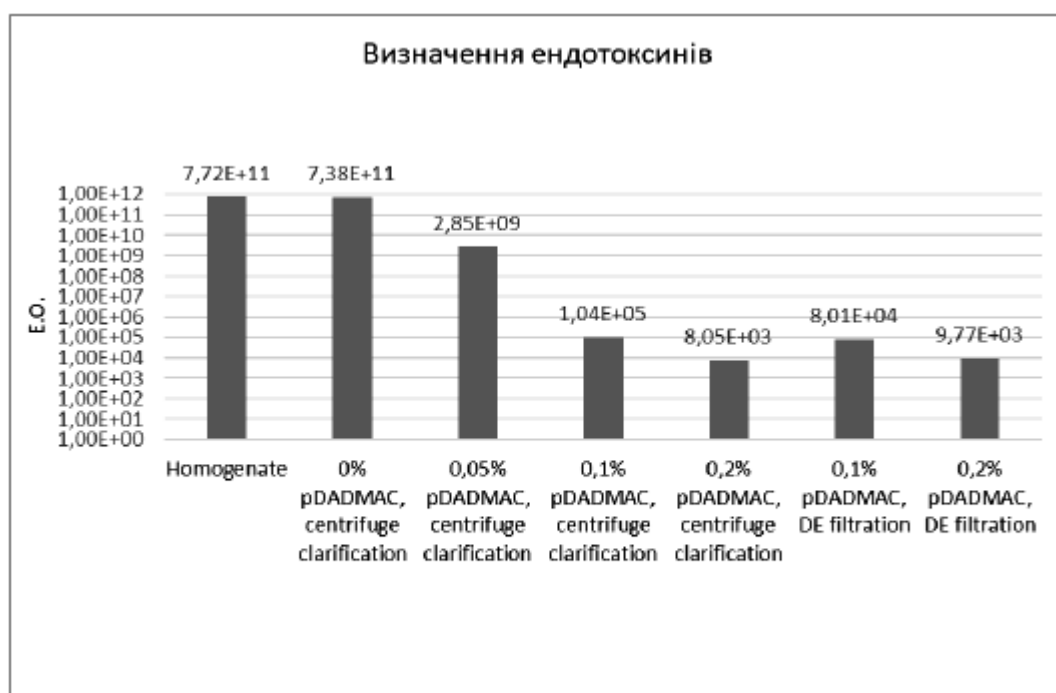
Фіг. 6. Графік «Визначення мутності спектрофотометричним методом (довжина хвилі 840 нм)»



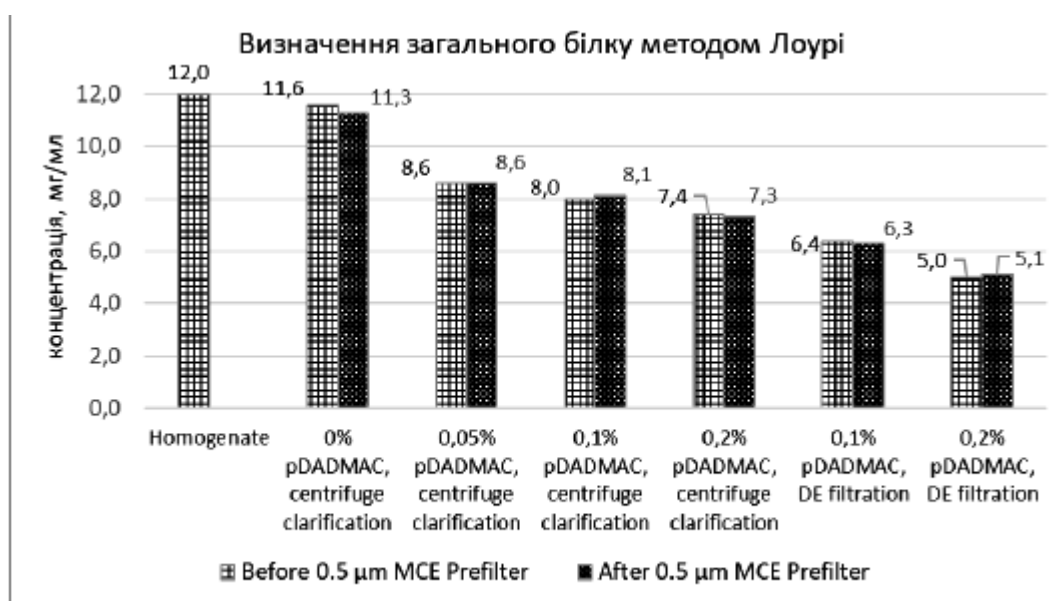
Фіг. 7. Графік «Вихід цільового ензиму гідроксистероїддегідрогенази в залежності від концентрації Clarisolve pDEDMAC в гомогенаті визначений за допомогою SDS-PAGE»



Фіг. 8. Графік «Визначення ДНК клітин-хазяїна».
Вміст ДНК визначали за допомогою флуоресцентного фарбування нуклеїнової кислоти Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA assay kit (Life technology, Waltham, MA, USA)



Фіг. 9. Графік «Визначення ендотоксинів». Визначення рівня ендотоксинів проводили з використанням комерційного набору ENDOLISA® (bioMérieux, Франція)



Фіг. 10. Графік «Визначення загального білку методом Лоурі»