



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **113293**

(13) **C2**

(51) МПК

C12N 1/08 (2006.01)

C12Q 1/25 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2014 04168	(72) Винахідник(и): Гофман Кетрин (US), Ко Дуглас (US), Ворд Майкл (US)
(22) Дата подання заявки: 20.09.2012	(73) Власник(и): ДАНІСКО ЮЕс ІНК., 925 Page Mill Road, Palo Alto, California 94304, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.01.2017	(74) Представник: Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/537,837	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WIEBE ET AL, "Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi - problems and improvements", MYCOLOGIST, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, CAMBRIDGE, GB, (20030801), vol. 17, no. 3, pages 140 - 144 KERÄNEN ET AL, "Production of recombinant proteins in the filamentous fungus Trichoderma reesei", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, (19950101), vol. 6, no. 6, pages 534 - 537 SISNIEGA HEIDI ET AL, "Strategies for large-scale production of recombinant proteins in filamentous fungi", METHODS IN BIOTECHNOLOGY HUMANA PRESS INC, 999 RIVERVIEW DR, STE 208, TOTOWA, NJ 07512-1165 USA SERIES : METHODS IN BIOTECHNOLOGY, (2005), pages 225 - 238 COOKE G D ET AL, "A modified Escherichia coli protein production strain expressing staphylococcal nuclease, capable of auto-hydrolysing host nucleic acid", JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, (20030320), vol. 101, no. 3, pages 229 - 239
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 22.09.2011	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.06.2014, Бюл.№ 11	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2017, Бюл.№ 1	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2012/056315, 20.09.2012	

(54) ЗАСТОСУВАННЯ АКТИВНОСТІ ЕНДОГЕННОЇ ДНКАЗИ ДЛЯ ЗНИЖЕННЯ ВМІСТУ ДНК

(57) Реферат:

Винахід належить до способу зниження вмісту ДНК у білковому препараті або культуральному бульйоні, отриманих з клітини-хазяїна, що є клітиною нитчастого гриба, за допомогою активності ендогенної ДНКазы нитчастого гриба-хазяїна.

UA 113293 C2

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА споріднену ЗАЯВКУ

[0001] Дана заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США № 61/537837, поданою 22 вересня 2011 р., яку включено в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

5 ПЕРЕДУМОВИ ВІНАХОДУ

[0002] Нитчасті гриби (наприклад, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Geosmithia*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Humicola* та інші) останнім часом стали популярними штамми-хазяїнами для одержання білків. Ферментні препарати, що виробляються видами грибів, такими як *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus oryzae*, *Geosmithia emersonii*, *Myceliophthora thermophila*, *Penicillium funiculosum*, *Fusarium venenatum* і *Humicola insolens*, розробляли як комерційні продукти. Нитчасті гриби, такі як *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Fusarium* та інші, також конструювали для експресії гетерологічних білків, наприклад, ферментів і терапевтичних білків, як правило, керованої індукцйбельними промоторами (див., наприклад, England і співавт., патентну публікацію за РСТ WO2004/035070). Багато білків, отриманих у такий спосіб з грибів (наприклад, *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum* і *H. insolens*), можна застосовувати як харчові або кормові добавки (див., наприклад, Dunn-Coleman і співавт., патентну публікацію за РСТ WO2003/038035) або в інших шляхах промислового застосування. У зв'язку з тим, що одержання білків за допомогою грибів зазвичай здійснюється у великих масштабах, поліпшення ефективності одержання й переробки може мати велике економічне значення.

КОРОТКИЙ ОПИС ФІГУР

[0003] Фігура 1. Ефект підвищених рН або температури стосовно розпаду ДНК, що спостерігається в концентраті ферментативного бульйону, отриманому шляхом ультрафільтрації, у якому міститься *T. reesei*, що експресує фітазу *Buttiauxella sp.*

[0004] Фігура 2. Ефект часу інкубування стосовно розпаду ДНК, що спостерігається в тому ж, що й описаний вище, концентраті ферментативного бульйону, отриманому шляхом ультрафільтрації, у якому міститься *T. reesei*, що експресує фітазу *Buttiauxella sp.*

[0005] Фігура 3. Ефект підвищених температур і часу інкубування стосовно розпаду ДНК, що спостерігається в тому ж, що й описаний вище, концентраті ферментативного бульйону, отриманому шляхом ультрафільтрації, у якому міститься *T. reesei*, що експресує фітазу *Buttiauxella sp.*

[0006] Фігури 4А-4В. Ефекти підвищеного рН стосовно розпаду ДНК, що спостерігається при рівнях рН 5,2, 6,3 і 7,6, який спостерігається в концентраті ферментативного бульйону, отриманому шляхом ультрафільтрації, у якому міститься *T. reesei*, що експресує ліпазу *Aspergillus tubingensis*.

КОРОТКИЙ ОПИС

[0007] Даний винахід забезпечує способи зниження вмісту ДНК у бульйоні, у якому культивували клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів. Такі способи включають коригування рН та/або температури бульйону, у якому культивували клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів, протягом щонайменше 24 годин, до значень рН та/або температури, що перевищують застосовувані у культивуванні, та інкубування бульйону при збільшених рН та/або температурі протягом періоду, достатнього для зниження рівня ДНК нитчастих грибів-хазяїнів у препараті, яке можна виявити. Зниження вмісту ДНК у таких способах переважно не зумовлене наявністю екзогенної ДНКаз в бульйоні. Деякі способи додатково включають здійснення етапу розділення рідкої і твердої фази для відокремлення бульйону від клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів, перед етапом коригування. Деякі способи додатково включають здійснення етапу ультрафільтрації, на якому макромолекули в бульйоні концентрують перед етапом коригування. У деяких способах бульйон має кімнатну температуру після етапу ультрафільтрації. У деяких способах температура бульйону перед етапом коригування становить від 25°C до 34°C. У деяких способах рН бульйону перед етапом коригування становить від 4 до 5. Деякі способи додатково включають культивування клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів, у бульйоні до досягнення бажаної концентрації секретованих білків, які становлять інтерес, у бульйоні перед етапом коригування. Етап коригування рН та/або температури переважно здійснюють перед тим, як фермент (ферменти), що вироблюється (вироблюються) клітиною-хазяїном, застосовують для обробки наміченого субстрату або впливу на нього.

[0008] У деяких способах рН збільшують до рН 6-8 у ході етапу коригування. У деяких способах температуру збільшують до 35°C-47°C у ході етапу коригування. Деякі способи додатково включають оцінювання вмісту ДНК у бульйоні. У деяких способах вміст ДНК можна

оцінити перед етапом інкубування та після нього. У деяких способах вміст ДНК знижується до рівня, який неможливо виявити, що оцінюють за допомогою ПЛР та/або гель-електрофорезу із забарвленням бромистим етидієм. Деякі способи додатково включають надання можливості бульйону охолонути до кімнатної температури після етапу інкубування. Деякі способи додатково включають очищення одного або декількох білків з бульйону. У деяких способах один або декілька білків у бульйоні експресуються рекомбінантним шляхом клітиною-хазяїном, що є клітиною нитчастого гриба. У деяких способах у клітинах-хазяїнах, що є клітинами нитчастих грибів, відсутня екзогенна ДНКаза. У деяких способах у бульйон не додають ДНКазу. У деяких способах клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів, експресують фермент целюлазу рекомбінантним шляхом. У деяких способах клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів, експресують фітазу рекомбінантним шляхом. У деяких способах клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів, експресують ліпазу рекомбінантним шляхом.

[0009] Даний винахід додатково забезпечує способи зниження вмісту ДНК у білковому препараті (у тому числі, наприклад, у культуральному бульйоні), отриманому з клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів. Ці способи включають етапи вимірювання рівня ДНК грибної клітини-хазяїна в білковому препараті, отриманому з клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів; коригування рН та/або температури білкового препарату до скоригованих рН та/або температури; інкубування білкового препарату при скоригованих рН та/або температурі протягом періоду, достатнього для зниження рівня ДНК клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів, у білковому препараті, яке можна виявити, і визначення зниження кількості ДНК клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів, у білковому препараті. Зниження в таких способах переважно не зумовлене наявністю екзогенної ДНКази в білковому препараті. У деяких способах кількість ДНК знижується до рівня, який неможливо виявити.

[0010] Даний винахід додатково забезпечує способи зниження вмісту ДНК у бульйоні, у якому культивували клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів. Ці способи включають етапи збільшення рН та/або температури бульйону, у якому культивували клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів, протягом щонайменше 24 годин і у якому здійснювали етап розділення рідкої і твердої фази для відокремлення бульйону від клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів; і інкубування бульйону при збільшених рН та/або температурі протягом періоду, достатнього для зниження рівня ДНК нитчастих грибів-хазяїнів у бульйоні, яке можна виявити. Зниження в таких способах переважно не зумовлене наявністю екзогенної ДНКази в бульйоні.

[0011] Даний винахід також забезпечує застосування активності ендогенної ДНКази клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів, для зниження рівня ДНК нитчастих грибів-хазяїнів у білковому препараті, отриманому з грибної клітини-хазяїна.

[0012] Даний винахід додатково забезпечує застосування активності ендогенної ДНКази клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів, для зниження рівня ДНК грибів-хазяїнів у культуральному бульйоні, у якому культивували грибні клітини-хазяїни.

[0013] У будь-якому з описаних вище способів або шляхів застосування грибною клітиною-хазяїном може являти собою клітину *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum* або *H. insolens*.

ВИЗНАЧЕННЯ

[0014] "ДНКаза" являє собою фермент, здатний здійснювати розпад ДНК, зазвичай шляхом розщеплення фосфодієфірного зв'язку. ДНКази включають ендонуклеази, що розщеплюють внутрішні сайти, та екзонуклеази, що відщеплюють мононуклеотиди від кінця молекули ДНК. ДНКази зазвичай являють собою білки, але також можуть бути небілковими ДНКазами. ДНКази можуть мати активність РНказ, а також активність ДНказ, або не мати їх.

[0015] "Екзогенний" білок (наприклад, екзогенна ДНКаза) стосується білка, який вводиться в штам-хазяїн за допомогою експресії рекомбінантних генів або який додається в екстракти штаму-хазяїна із зовнішнього джерела білка. Екзогенний білок може бути гетерологічним стосовно штаму-хазяїна (тобто вироблюваним природно іншим штамом-хазяїном) або гомологічним (тобто вироблюваним природно даним штамом-хазяїном).

[0016] Вираз "рекомбінантний" стосується полінуклеотиду або поліпептиду, який не трапляється в природі в клітині-хазяїні. Рекомбінантна молекула може містити дві або більше послідовностей, що трапляються в природі, з'єднаних таким чином, що не трапляється в природі.

[0017] Вираз "гетерологічний" стосується елементів, зазвичай не зв'язаних один з одним. Наприклад, якщо клітина-хазяїн виробляє гетерологічний білок, то такий білок зазвичай не виробляється в цій клітині-хазяїні. Так само, промотор, функціонально пов'язаний з гетерологічною кодуючою послідовністю, є промотором, функціонально пов'язаним з кодуючою

послідовністю, з якою він зазвичай не пов'язаний функціонально в клітині-хазяїні дикого типу. Вираз "гомологічний" стосовно до полінуклеотиду (наприклад, ДНК) або білка стосується нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК) або білка, що трапляються в природі в клітині-хазяїні.

5 [0018] "Ген" стосується сегмента ДНК, що бере участь у виробленні поліпептиду, і включає області, розташовані перед кодуєчим сегментом (сегментами) (екзонами) і після них, а також, у деяких генах, вбудовані сегменти (інтрони) між окремими кодуєчими сегментами.

[0019] Нуклеїнові кислоти включають одониткові або двониткові ДНК і РНК та їх хімічно модифіковані варіанти.

10 [0020] "Вектор" являє собою послідовність полінуклеотиду, призначену для введення нуклеїнових кислот у клітини одного або декількох типів. Вектори включають клонувальні вектори, вектори експресії, човникові вектори, плазміди, фагові частинки, касети тощо.

[0021] "Фітаза" являє собою фермент, який каталізує гідроліз фітату до (1) міоїнозиту та/або (2) його моно-, ди-, три-, тетра- та/або пентафосфатів і (3) неорганічного фосфату. Наприклад, фітази включають ферменти, що визначаються шифром КФ 3.1.3.8 або шифром КФ 15 3.1.3.26.

[0022] "Ферменти целюлази" або "целюлази" включають ферменти, що чинять пряму дію на целюлозу, і допоміжні ферменти, що сприяють прямій дії інших ферментів на целюлозу. Целюлази включають екzogлюканази або екзоцелобіогідролази, та/або ендоглюканази, та/або β-глюкозидази бактерій або грибів. Ці три різні типи ферментів целюлаз діють синергічно, 20 перетворюючи целюлозу та її похідні на глюкозу. Ферменти целюлази також включають допоміжні ферменти, у тому числі представників GH61, таких як EG4, своленін, лузенін, CIP1 тощо.

[0023] "Ліпаза" являє собою фермент, який каталізує гідроліз або утворення ліпідів. Наприклад, ліпази каталізують гідроліз триацилгліцерину з одержанням діацилгліцерину та 25 карбоксилату. Ліпази включають ферменти, що визначаються шифром КФ 3.1.1.3.

[0024] "Виділений" означає, що цільовий зразок вилучено з щонайменше одного компонента, з яким він зазвичай пов'язаний.

30 [0025] "Очищений" означає, що цільовий зразок щонайменше на 50 % (вага/вага) і в деяких випадках щонайменше на 75, 90, 95 або 99 % (вага/вага) вільний від макромолекулярних домішок, які застосовувалися під час його одержання або очищення, але не виключає наявності наповнювачів, що додають для полегшення застосування цільового зразка.

[0026] Білковий препарат містить один або кілька бажаних білків, які секретуються нитчастим грибом-хазяїном (наприклад, *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum*, *H. insolens* та іншими), у будь-якому стані чистоти й 35 може також містити домішки, які застосовують для одержання або очищення бажаного білка (білків), або додані наповнювачі. Таким чином, білковий препарат може являти собою бульйон або білок (білки), очищений (очищені) з бульйону.

[0027] Бульйон або "ферментативний бульйон" стосується культурального середовища, яке застосовують для культивування клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів (наприклад, *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum* і *H. insolens*) з видаленням клітин і клітинного дебрису після ферментації або без 40 цього та з концентруванням білків та інших макромолекул у бульйоні за допомогою ультрафільтрації або подібної методики або без цього, але не включає препарат очищених білків, у якому бажаний білок (білки) відокремлений (відокремлені) від бульйону за допомогою методик, таких як осадження й ресуспендування білків у свіжоприготовленому середовищі або 45 колонкова хроматографія та елювання у свіжоприготовленому середовищі.

[0028] Вираз "нитчасті гриби" стосується всіх нитчастих форм підвідділу Eumycotina (див. Alexopoulos, C. J. (1962), *INTRODUCTORY MYCOLOGY*, Wiley, New York та AINSWORTH AND 50 BISBY *DICTIONARY OF THE FUNGI*, 9.sup.th Ed. (2001) Kirk et al., Eds., CAB International University Press, Cambridge UK). Ці гриби характеризуються вегетативним міцелієм із клітинною стінкою, що складається з хітину, целюлози та інших складних полісахаридів. Нитчасті гриби за даним винаходом морфологічно, фізіологічно й генетично відрізняються від дріжджів. Вегетативний ріст нитчастих грибів здійснюється за рахунок подовження гіф, а катаболізм вуглецю є облігатно-аеробним.

55 [0029] Вираз "*Trichoderma*" або "*Trichoderma* sp." стосується будь-якого роду грибів, який раніше або в даний час класифікують як "*T.*", і гібридів таких штамів, а також їх генетично модифікованих форм (наприклад, модифікованим за допомогою мутації, або трансгена, або нокауту гена).

60 [0030] "Корм" означає будь-які природні або штучні продукти харчування, їжу або подібне або компоненти такої їжі, призначені для поїдання, вживання, поглинання твариною, відмінною

від людини, або які підходять для цього.

[0031] "Харчі" означають будь-які природні або штучні продукти харчування, їжу або подібне або компоненти такої їжі, призначені для поїдання, вживання, поглинання людиною, або які підходять для цього.

[0032] "Харчова або кормова добавка" являє собою очищену сполуку або композицію з декількох компонентів, призначені для додавання в їжу або корм або такі, що підходять для цього. Вона може включати одну або декілька сполук, таких як вітаміни, мінеральні речовини, ферменти і придатні носії та/або наповнювач.

[0033] Такі вирази, як "оцінювати", "вимірювати" або "визначати", охоплюють якісне або кількісне виявлення аналізованої речовини, зокрема, ендогенної ДНК. Таке оцінювання або визначення може, таким чином, указувати на наявність або відсутність аналізованої речовини або кількості аналізованої речовини.

[0034] Вираз "який містить" та спільнокореневі слова до нього застосовують у їхньому вичерпному значенні, тобто він є еквівалентним виразу "який включає" та відповідним однокореневим словам до нього.

[0035] Якщо з контексту явно не впливає інше, посилання на конкретну чисельну величину охоплює зазначену величину й відхилення, властиве у зв'язку з її вимірюванням (тобто +/- SEM).

[0036] Якщо з контексту явно не впливає інше, "близько" вказує на припустиме відхилення, що становить +/- 10 %.

[0037] Числові діапазони включають числа, що визначають діапазон. Також перелічено деякі переважні піддіапазони, але в кожному разі посилання на діапазон включає всі піддіапазони, які визначаються цілими числами, включеними в діапазон.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

I. Загальна інформація

[0038] Дана заявка забезпечує спосіб зниження вмісту ДНК у білковому препараті, отриманому з нитчастих грибів, без необхідності застосування екзогенної ДНКаз. Дана заявка частково базується на спостереженні активності ендогенної ДНКаз нитчастих грибів у культуральних бульйонах разом з комерційно цінними білками. Наприклад, активність ДНКаз виявляють у культуральному бульйоні, у якому міститься *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum*, *H. insolens* або інший штам, що експресує та/або виробляє певний промисловий фермент (ферменти), що становить інтерес. Хоча для практичного здійснення даного винаходу не потрібне розуміння механізму, вважається, що активність ендогенних ДНКаз може бути зумовлена вивільненням однієї або декількох секретованих ДНКаз, ендогенних стосовно до нитчастого гриба (наприклад, *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum*, *H. insolens* тощо), або однієї або декількох внутрішньоклітинних ДНКаз таких нитчастих грибів у зв'язку з лізисом клітин.

[0039] Таку активність ендогенних ДНКаз можна застосовувати для зниження вмісту або усунення молекул ДНК з культурального бульйону, у якому містяться нитчасті гриби, наприклад, з культурального бульйону, у якому містяться *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum* або *H. insolens*. Видалення таких молекул ДНК можна застосовувати в багатьох шляхах застосування, наприклад, в одержанні ферментного препарату у формі харчової або кормової добавки або біологічно активної добавки. Регуляторні органи вимагають, щоб деякі комерційні ферментні препарати, зокрема, застосовувані в одержанні харчів або кормів, не містили ДНК хазяїна, яку можна виявити, або принаймні містили ДНК хазяїна на рівні, нижчому за певну межу. Хоча ДНК грибів (наприклад, ДНК *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum*, *H. insolens* тощо) у культуральному бульйоні можна видалити за допомогою екзогенної ДНКаз, експресія такої ДНКаз рекомбінантним шляхом або її подача в культуральний бульйон передбачає додаткові етапи, зростання витрат і, можливо, зниження ефективності. Спосіб за даним винаходом забезпечує простий метод видалення генетичного матеріалу хазяїна з білкового препарату без необхідності маніпуляцій з генами клітини-хазяїна або додавання ДНКаз (ДНКаз) у препарат.

II. Штами-хазяїни, що є штамми нитчастих грибів

[0040] Для практичного здійснення даного винаходу можна застосовувати будь-які придатні штамми-хазяїни, що є штамми грибів, здатні до експресії білків гетерологічних або ендогенних видів. Наприклад, штамми-хазяїни, що є штамми грибів, можуть являти собою штамми-хазяїни, що є штамми видів нитчастих грибів, як, наприклад, таких з типу *Ascomycota* і підтипу *Peizizomycotina*. Такі організми включають клітини нитчастих грибів, застосовувані для

одержання комерційно важливих промислових і фармацевтичних білків, у тому числі, але без обмежень, *Trichoderma* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Chrysosporium* spp., *Talaromyces* spp., *Geosmithia* spp., *Myceliophthora* spp. і *Neurospora* spp. Конкретні організми, з яких можуть бути отримані придатні штами-хазяїни, можуть включати, але без обмежень, *Trichoderma reesei* (раніше класифікований як *Trichoderma longibrachiatum* і *Hypocrea jecorina*), *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus itaconicus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus tubingensis*, *Humicola insolens*, *Humicola grisea*, *Thermomyces lanuginosus*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Talaromyces* (*Geosmithia*) *emersonii*, *Fusarium venenatum*, *Fusarium graminearum*, *Myceliophthora thermophila* і *Chrysosporium lucknowense*. Штами-хазяїни, що є штамами грибів, також можуть бути штамами-хазяїнами, що є штамами видів нитчастих грибів, як, наприклад, таких з типу *Basidiomycota* або підтипу *Mucormycotina*. Такі організми включають клітини нитчастих грибів, застосовувані для одержання комерційно важливих промислових і фармацевтичних білків, у тому числі, але без обмежень, *Agaricus* spp., *Phanerochaete* spp., *Schizophyllum* spp., *Rhizomucor* spp. і *Mucor* spp. Конкретні організми, з яких можуть бути отримані придатні штами-хазяїни, можуть включати, але без обмежень, *Agaricus bisporus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Schizophyllum commune*, *Rhizomucor miehei* і *Mucor circinelloides*.

[0041] Очікується, що в продуктах ферментації (наприклад, у білковому препараті, у тому числі, наприклад, у культуральному бульйоні), отриманих з перелічених вище та інших видів нитчастих грибів, буде існувати активність ендогенної ДНКази на деякому рівні. Рівень активності ДНКази та рН або температура, оптимальні для ДНКази, можуть варіювати між окремими видами й серед усіх видів. Проте, коригування, які здійснюють стосовно рН, температури й часу інкубування, описані в даному документі, можна тестувати з метою визначення необхідних умов для видалення ДНК відповідно до даного розкриття.

[0042] У конкретному варіанті здійснення будь-якого зі способів за даним винаходом клітина-хазяїн є клітиною *T. reesei*, добре відомого нитчастого гриба. Приклади штамів *T. reesei* включають № 13631 в ATCC, № 26921 в ATCC, № 56764 в ATCC, № 56765 в ATCC, № 56767 в ATCC і № 15709 в NRRL. Один приклад клітини-хазяїна отримано зі штаму RL-P37 *T. reesei* (описаного в Sheir-Neiss et al. (1984) Appl. Microbiol. Biotechnology 20:46-53). Інша клітина-хазяїн являє собою штам Morph 1.1 (pyr+) *T. reesei*, спонтанний ревертант за pyr4 штаму RL-P37 *T. reesei* з делецією у чотирьох генах (описаного в патентній публікації за PCT WO 05/001036). Інші штами-хазяїни, подібні до RL-P37, включають штам RUT-C30 (№ 56765 в ATCC) і штам QM9414 (№ 26921 в ATCC) *T. reesei* (*longibrachiatum*).

[0043] У певних варіантах здійснення штам-хазяїн може зазнавати маніпуляції з генами за допомогою генної інженерії, класичного мутагенезу або шляхом утворення гібридів наявних штамів. Генну інженерію можна застосовувати для введення екзогенних генів або нокауту або нокадауну ендогенних генів. Мутагенез можна застосовувати для пригнічення або нокауту ендогенних генів або, у деяких клітинах-хазяїнах, змінення або посилення функції ендогенних генів. Приклади включають мутантів, що характеризуються надсинтезом, описаних, наприклад, Bower і співавт. у патентній публікації за PCT WO2008/153903. Приклади також включають штами-хазяїни, у яких різні нативні гени грибних клітин-хазяїнів було інактивовано. Інактивацію генів можна здійснювати за допомогою повної або часткової делеції, за допомогою інактивації вставкою або за допомогою будь-яких інших способів, які роблять ген нефункціональним щодо його призначення (експресія функціонального білка за допомогою даного гена, таким чином, запобігається). Приклади способів інактивації генів містяться, наприклад, у патентах США №№ 5246853 і 5475101 та в патентній публікації за PCT WO 92/06209. У деяких хазяїнів можна інактивувати один або декілька генів, що кодують целюлолітичні ферменти, такі як ендоглюканази (EG) і екзоцелобіогідролази (CBH) (наприклад, *cbh1*, *cbh2*, *egl1* або *egl2*). Наприклад, у патенті США № 5650322 розкриті штами, що є похідними RL-P37, з делеціями як у гені *cbh1*, так і в гені *cbh2*. У конкретному прикладі "делеція в чотирьох генах" *cbh1*, *cbh2*, *egl1* і *egl2* описана в патенті США № 5847276 і в патентній публікації за PCT WO 05/001036. У ще одному додатковому прикладі певні клітини-хазяїни можна піддавати маніпуляціям таким чином, що вони стають штамами з дефіцитом або відсутністю протеаз, так що ризик розпаду білків, що становлять інтерес, які експресуються такими штамами, знижується або зменшується.

[0044] Як зазначено, способи за даним винаходом, такі як методи, описані в EP658621 або патентній публікації за PCT WO2008065200, не вимагають доповнення культури клітин-хазяїнів екзогенною ДНКазою. Однак, хоча це й не потрібно, але можна застосовувати клітини-хазяїни, у яких одна або декілька екзогенних ДНКаз експресуються рекомбінантним шляхом, за умови, що активність ДНКаз, що використовується в способі, не є переважно активністю екзогенної ДНКази

(ДНКаз). У деяких таких клітинах-хазяїнах екзогенна ДНКаз не експресується в активній формі (наприклад, вона експресується в тільцях-включеннях) або експресується лише незначною мірою. У деяких таких клітинах-хазяїнах екзогенна ДНКаз не характеризується позаклітинною секрецією (наприклад, не має сигнального пептиду). Якщо в культуральному бульйоні або іншому білковому препараті перебуває яка-небудь екзогенна ДНКаз, то внесок такої екзогенної ДНКазі в розпад ДНК хазяїна становить не більше 49 % (наприклад, не більше 49 %, не більше 45 %, не більше 40 %, не більше 35 %, не більше 30 %, не більше 25 %, не більше 20 %, не більше 15 %, не більше 10 % або не більше 5 %) від загальної активності ДНКазі. Це можна продемонструвати, показавши, що за умов температури й рН, які застосовували в аналізі (наприклад, рН 7,0 при температурі 40°C), час, який витрачається на зниження вмісту ендогенної ДНК до рівня, який неможливо виявити, збільшується не більше ніж на 49 % (наприклад, не більше ніж на 49 %, не більше ніж на 45 %, не більше ніж на 40 %, не більше ніж на 35 %, не більше ніж на 30 %, не більше ніж на 25 %, не більше ніж на 20 %, не більше ніж на 15 %, не більше ніж на 10 % або не більше ніж на 5 %) і переважно збільшується менше ніж на 25 % або 10 % за відсутності екзогенної ДНКазі (ДНКаз) порівняно з таким у випадку її (їх) присутності. Інакше кажучи, за розпад ДНК клітини-хазяїна (наприклад, *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum*, *H. insolens* тощо) у культуральному бульйоні або іншому білковому препараті переважно відповідає активність ендогенної ДНКазі.

[0045] Штам-хазяїн можна застосовувати для експресії й переважно секреції одного або декількох ендогенних або екзогенних ферментів або комбінації ендогенних і екзогенних ферментів. Деякі приклади типів ферментів, які можуть характеризуватися ендогенною або екзогенною експресією, включають амілолітичні ферменти, протеолітичні ферменти, ферменти целюлази, ферменти оксидоредуктази й ферменти, що руйнують клітинну стінку рослин. Конкретніше, такі ферменти включають амілази, протеази, ксиланази, ліпази, лакази, фенолоксидази, оксидази, кутинази, целюлази, геміцелюлази, естерази, пероксидази, каталази, глюкозооксидази, фітази, пектинази, глюкозидази, ізомерази, трансферази, галактозидази та хітинази.

[0046] Альтернативно або додатково, штам-хазяїн можна сконструювати для експресії й переважно секреції гормонів, ферментів, факторів росту, цитокінів, антитіл тощо. Деякі приклади гормонів, які можуть експресуватися, включають фолікулоstimулювальний гормон, лютеїнізувальний гормон, кортикотропін-вивільнювальний фактор, соматостатин, гонадотропний гормон, вазопресин, окситоцин, еритропоетин, інсулін тощо.

[0047] Фактори росту являють собою білки, що зв'язуються з рецепторами на поверхні клітини, які переважно зумовлюють активацію проліферації та/або диференціювання клітин. Деякі приклади факторів росту, що експресуються, включають тромбоцитарний фактор росту, епідермальний фактор росту, фактор росту нервів, фактори росту фібробластів, інсуліноподібні фактори росту, трансформувальні фактори росту тощо.

[0048] Цитокіни являють собою особливу родину факторів росту. Цитокіни, які секретуються переважно лейкоцитами, стимулюють як гуморальну, так і клітинну імунні відповіді, а також активацію фагоцитарних клітин. Деякі приклади цитокінів, що експресуються, включають колоніестимулювальні фактори, інтерлейкіни (IL-1 α і β , IL-2 — IL-13) та інтерферони (α , β і γ).

[0049] Клітини-хазяїни також можна сконструювати для експресії антитіл. Людські, гуманізовані, химерні або веніровані антитіла є переважними. Антитіла можуть бути будь-якого класу та ізотипу, тобто G1, 2, 3 і 4 і A, M, E або D.

[0050] У певних варіантах здійснення сегмент нуклеїнової кислоти, що кодує екзогенний білок, клонують у вектор експресії. Сегмент нуклеїнової кислоти, що кодує екзогенний білок, можна помістити у функціональному зв'язку із сигнальним пептидом, що надає здатність до секреції, або його можна помістити у функціональному зв'язку із промотором і в деяких випадках з іншими регуляторними послідовностями для належної експресії. Вектор експресії, що кодує поліпептид, можна вводити в клітину-хазяїна шляхом трансфекції або трансформації за допомогою стандартних методик, описаних, наприклад, в Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Нуклеїнову кислоту також можна переносити в клітини за допомогою вектора на основі ретровірусу (див., наприклад, Ferry et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 8377-8381; і Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3: 641-647), вектора на основі аденовірусу (див., наприклад, Rosenfeld (1992) *Cell* 68: 143-155; і Herz and Gerard (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:2812-2816), рецепторно-опосередкованого впровадження ДНК (див., наприклад, Wu, and Wu (1988) *J. Biol. Chem.* 263:14621; Wilson et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: 963-967; і патент США № 5166320), прямої ін'єкції ДНК (див., наприклад, Acsadi et al. (1991) *Nature* 332: 815-818 і Wolff et al. (1990) *Science*

247:1465-1468) або бомбардування частинками (біобалістичного способу) (див., наприклад, Cheng et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:4455-4459; Zelenin et al. (1993) FEBS Letts. 315: 29-32).

[0051] Можна застосовувати як епісомні, так і інтегровальні вектори експресії. Для ідентифікації інтегрантів, отриманих за допомогою інтегровального вектора, ген, що містить маркер, за яким здійснюють селекцію (наприклад, стійкості до лікарських засобів), вводять у клітини-хазяїни разом з нуклеїновою кислотою, що становить інтерес. Приклади маркерів, за якими здійснюють селекцію, включають маркери, що надають стійкість до певних лікарських засобів, таких як G418 і гігromіцин. Маркери, за якими здійснюють селекцію, й нуклеїнову кислоту, що становить інтерес, можна вводити в окремих векторах або в одному й тому самому векторі. Трансфіковані клітини-хазяїни можна згодом ідентифікувати шляхом селекції клітин за допомогою маркера, за яким здійснюють селекцію. Наприклад, якщо маркер, за яким здійснюють селекцію, кодує ген, що надає стійкість до неоміцину, клітини-хазяїни, в які помістили нуклеїнову кислоту, можна ідентифікувати за їхнім ростом за присутності G418. Клітини, в які впровадили маркерний ген, за яким здійснюють селекцію, виживуть, тоді як інші клітини загинуть.

[0052] Після експресії поліпептид можна очистити відповідно до традиційних методів, включаючи афінне очищення, осадження за допомогою сульфату амонію, іонообмінну хроматографію або гель-електрофорез (див. загалом R. Scopes (1982) Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) Methods in Enzymology Vol. 182:Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y.). Альтернативно, поліпептид після експресії можна піддавати мінімальним маніпуляціям або не піддавати їм, а отже, його застосовують у композиції, по суті аналогічній культуральному бульйону, у якому містяться клітини-хазяїни, які експресують його.

III. Культивування клітини-хазяїна, що є клітиною нитчастого гриба

[0053] Бажані білки, такі як ферменти целюлази, кормові ферменти або інші ферменти, можуть вироблятися клітинами нитчастих грибів-хазяїнів (наприклад, *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum*, *H. insolens* тощо) в умовах твердофазного або глибинного культивування, у тому числі за допомогою способів періодичного культивування, культивування з підживленням і культивування в безперервному потоці. Культивування з підживленням широко застосовують у зв'язку з легкістю його контролю, одержанням постійної кількості продуктів і економічно найвигіднішим застосуванням усього обладнання.

[0054] Культивування (що іноді має назву ферментації) можна проводити в рідкому (наприклад, у водному) середовищі або у твердому середовищі, і спосіб за даним винаходом можна застосовувати до обох. Культивування в певних типових варіантах здійснення здійснюють у бульйоні, що містить водне середовище з мінеральними солями, органічні фактори росту, матеріал, що є джерелом вуглецю або енергії, засвоюваний азот, молекулярний кисень і стартовий інокулят використовуваних видів грибів-хазяїнів. Мінеральні середовища в прийнятному випадку містять певну кількість фосфору, магнію, кальцію, калію, сірки та/або натрію в розчинних засвоюваних іонних і комбінованих формах, а також переважно містять слідові елементи, такі як мідь, марганець, молібден, цинк, залізо, бор та/або йод та інші, також у прийнятній розчинній засвоюваній формі. Мінеральні поживні речовини можуть сприяти належному росту мікроорганізмів, максимізуючи засвоєння джерела вуглецю й енергії клітинами в ході процесу мікробної конверсії й забезпечуючи досягнення максимальних показників урожаю клітин.

[0055] Джерелом засвоюваного азоту може бути будь-яка азотовмісна сполука або сполуки, здатні вивільняти азот у формі, придатній для утилізації мікроорганізмом у ході метаболізму. Хоча можна використовувати різноманітні органічні сполуки, що є джерелами азоту, такі як гідролізати білків, зазвичай можна використовувати недорогі азотовмісні сполуки, такі як аміак, гідроксид амонію, сечовина або різні солі амонію, такі як фосфат амонію, сульфат амонію, пірофосфат амонію, хлорид амонію або різні інші сполуки амонію. Газоподібний аміак сам собою є зручним для великомасштабних операцій, і його бульбашки можна пропускати через водний ферментаційний розчин (ферментаційне середовище) у відповідній кількості. Аміак також може сприяти регуляції pH.

[0056] Культивування являє собою аеробний спосіб, зазвичай пов'язаний із участю молекулярного кисню, що подається в газі, який містить молекулярний кисень, такому як повітря, повітря, збагачене киснем, або навіть практично чистий молекулярний кисень, який надають для підтримки вмісту ферментаційного чана в умовах відповідного парціального тиску кисню, ефективного в сприянні бурхливому росту видів мікроорганізмів. По суті, у разі

застосування кисневмісного вуглеводневого субстрату потреба в кисні для росту мікроорганізмів знижується. Проте, молекулярний кисень подають для росту, оскільки засвоєння субстрату та відповідний ріст мікроорганізмів почасти являють собою процес окиснення.

5 [0057] Хоча швидкість аерації може варіювати в межах значного діапазону, аерацію зазвичай проводять при швидкості, що перебуває в діапазоні від близько 0,5 до 10, переважно від близько 0,5 до 7 об'ємів (при використуваному тиску й при 25°C) кисневмісного газу на об'єм рідини у ферментері на хвилину. Ця кількість основана на кількості повітря зі звичайним вмістом кисню, що подається в реактор, і в перерахунку на чистий кисень відповідні діапазони
10 будуть становити від близько 0,1 до 1,7 або переважно від близько 0,1 до 1,3 об'єму (при використуваному тиску й при 25°C) кисню на об'єм рідини у ферментері на хвилину.

[0058] Тиск для ферментації також може варіювати в широкому діапазоні. Значення тиску зазвичай перебувають у межах діапазону від близько 0 до 50 фунт/кв.дюйм надп., переважно від близько 0 до 30 фунт/кв. дюйм надп., переважніше на рівні, який щонайменше незначно
15 перевищує атмосферний тиск, оскільки в цьому випадку можна досягти балансу між витратами на обладнання й експлуатацію та розчинністю кисню. Тиск, що перевищує атмосферний, є переважним для збільшення концентрації розчиненого кисню, що своєю чергою може надати допомогу в збільшенні темпу росту клітин. При вищому тиску, однак, збільшуються витрати на обладнання та експлуатацію.

20 [0059] Температура ферментації може певною мірою варіювати. Наприклад, для *T. reesei* температура зазвичай перебуває в межах діапазону від близько 20°C до близько 40°C, зазвичай переважно в діапазоні від близько 25°C до близько 34°C. Переважна температура ферментації для *T. reesei* перебуває в межах діапазону від близько 27°C до близько 30°C.

[0060] Діапазон pH у водному розчині для мікробіологічної ферментації (ферментаційній суміші) може, наприклад, являти собою діапазон від близько 2,0 до близько 8,0. Для нитчастих
25 грибів pH зазвичай перебуває в діапазоні від близько 2,5 до близько 8,0; наприклад, для *T. reesei* pH зазвичай перебуває в діапазоні від близько 3,0 до близько 7,0. Переважний діапазон pH для *T. reesei* являє собою діапазон від близько 3,5 до близько 5,0.

[0061] Хоча середній час утримання ферментаційної суміші у ферментері може значною
30 мірою варіювати, частково залежно від використуваних температури ферментації та культури, він зазвичай перебуває в діапазоні від близько 24 до близько 500 годин, переважно від 24 до 400 годин. У певних варіантах здійснення грибні клітини-хазяїни культивують протягом щонайменше 24 годин, наприклад, протягом щонайменше 48 годин, щонайменше 72 годин або щонайменше 96 годин. Наприклад, *T. reesei* переважно культивують протягом щонайменше 24
35 годин, як, наприклад, протягом щонайменше 48 годин, щонайменше 72 годин або щонайменше 96 годин. Ферментацію переважно продовжують до тих пір, поки щільність клітин та/або концентрація одного або декількох секретованих білків, що становлять інтерес, не наблизиться до попередньо визначеного бажаного рівня. Те, чи було досягнуто цього бажаного рівня, можна визначити за допомогою періодичного відбирання зразків з ферментаційного бака. Конкретний бажаний рівень щільності клітин та/або концентрації одного або декількох секретованих білків,
40 що становлять інтерес, може варіювати, і його можна встановити, враховуючи низку чинників. У певних варіантах здійснення конкретний бажаний рівень можна встановити на момент, коли продуктивність клітини-хазяїна починає падати. У певних інших варіантах здійснення конкретний бажаний рівень можна встановити на момент, коли ферментаційний бак стає надто повним, щоб надавати можливість продовження ефективної ферментації. У ще декількох додаткових варіантах здійснення конкретний бажаний рівень можна гнучко встановити на момент, коли ферментаційний бак просто є потрібним для здійснення іншого прогону ферментації. Конкретний бажаний рівень щільності клітин можна встановити, враховуючи будь-який один, два або всі описані вище чинники.

50 [0062] У деяких способах розпаду під дією ДНКаз будь-яке підвищення pH та/або температури після ферментації оцінюють стосовно pH і температури в ході ферментації. Якщо pH або температура протягом періоду ферментації змінюються значно (тобто більше ніж на 2°C або 0,5 одиниці pH), то як вихідний рівень для порівняння застосовують середнє значення pH або температури протягом періоду ферментації. Альтернативно, зокрема, якщо pH або температура змінюються незначно, то можна застосовувати однократне вимірювання,
55 наприклад, на початку або наприкінці періоду ферментації.

[0063] Ферментацію переважно проводять таким чином, щоб кількість вуглецевмісного субстрату регулювалася як лімітувальний чинник, забезпечуючи, таким чином, гарну конверсію вуглецевмісного субстрату в клітинах і уникаючи забруднення клітин значною кількістю неконвертованого субстрату. Неконвертовані субстрати, однак, не є проблемою, якщо такі
60

субстрати є водорозчинними, оскільки будь-які слідові кількості таких субстратів, що залишаються, легко вимиваються. Проте, для субстратів, що не є водорозчинними, може бути необхідним додавання етапів обробки продукту, таких як етапи належного промивання.

[0064] Частину матеріалу, що є джерелом вуглецю й енергії, або весь матеріал та/або частину джерела засвоюваного азоту, такого як аміак, можна додавати у водне мінеральне середовище перед подачею такого середовища у ферментер.

[0065] Кожний з потоків, що вводяться в реактор, переважно регулюють при заданій швидкості або у відповідь на необхідність, що визначається шляхом відстеження, наприклад, концентрації вуглецевого й енергетичного субстрату, pH, концентрації розчиненого кисню, кисню або діоксиду вуглецю у відхідних газах, які відводять з ферментера, щільності клітин, яку вимірюють за допомогою пропускання світла, або подібним чином. Інтенсивність подачі різних матеріалів можна варіювати для того, щоб досягти якомога швидшого темпу росту клітин, що узгоджується з ефективною утилізацією джерела вуглецю й енергії, з одержанням якомога вищого врожаю клітин мікроорганізмів стосовно до завантаження субстрату.

[0066] У процесі здійснення періодичного культивування або переважного культивування з підживленням усе обладнання, реактор або прилад для ферментації, чан або контейнер, систему трубок, супровідні циркуляційні або охолоджувальні пристрої і подібне спочатку стерилізують, що можна виконати, наприклад, використовуючи пару, як, наприклад, при температурі близько 121°C, протягом тривалого періоду, такого як, наприклад, щонайменше 15 хвилин. У стерилізований реактор згодом інокують культуру обраного мікроорганізму за присутності всіх необхідних поживних речовин, включаючи кисень і вуглецевмісний субстрат.

[0067] Ферментативний бульйон зазвичай містить клітинний дебрис, у тому числі клітини, різні суспендовані тверді речовини й інші домішки біомаси, включаючи ДНК грибів-хазяїнів, а також бажані білки або білки, що становлять інтерес. Переважно, щонайменше близько 40 %, наприклад, щонайменше близько 50 %, щонайменше близько 75 % або щонайменше близько 90 % загальної кількості кожного бажаного білка, що експресується, секретується в бульйон до кінця ферментації.

IV. Зниження вмісту ДНК у білковому препараті, отриманому з грибів

[0068] Після того, як у ході ферментації одержали бажану щільність клітин або концентрацію білка, бульйон, який застосовували у культивуванні, або білковий препарат, отриманий з нього, можна згодом піддавати обробці для зниження вмісту ДНК у ньому. Вважається, що типовий грибний організм-хазяїн або клітина-хазяїн (наприклад, *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum* або *H. insolens*) може виробляти одну або декілька ДНКаз, які можуть бути присутніми у бульйоні з культурою клітин після секреції або в результаті лізису клітин, що зумовлює активність, спрямовану на розпад ДНК. Вміст ДНК у білковому препараті, отриманому в такий спосіб із грибів, можна знизити винятково або щонайменше переважно за рахунок активності ендогенної ДНКаз без екзогенної ДНКаз або за її незначної кількості в білковому препараті.

[0069] ДНК можна вилучити з бульйону після завершення ферментації без додаткової обробки бульйону. Альтернативно, для видалення клітин і клітинного дебрису з бульйону (тобто щонайменше зниження їх кількості в ньому) перед видаленням ДНК можна здійснювати щонайменше один етап розділення рідкої і твердої фази. У деяких способах після видалення клітин і твердих речовин білки в бульйоні концентрують і в деяких випадках додатково очищують перед видаленням ДНК. Однак, у ході будь-яких етапів очищення, які здійснюють перед інкубуванням для видалення ДНК, бажаний білок (білки) переважно не слід відокремлювати від ферментів з активністю ДНКаз, і в будь-якому випадку не слід усувати активність ДНКаз більше ніж на 10 % (наприклад, більше ніж на 20 %, більше ніж на 30 %, більше ніж на 40 % або більше ніж на 50 %). Аналогічно, у ході будь-яких етапів, які здійснюють перед інкубуванням для видалення ДНК, активність ДНКаз переважно не повинна інактивуватися, і в будь-якому випадку активність ДНКаз не повинна інактивуватися більше ніж на 10 % (наприклад, більше ніж на 20 %, більше ніж на 30 %, більше ніж на 40 % або більше ніж на 50 %).

[0070] Клітини та клітинний дебрис можна видаляти за допомогою традиційних методик розділення рідкої і твердої фази, таких як, наприклад, центрифугування, фільтрація, діаліз, мікрофільтрація, вакуум-фільтрація в обертовому барабані або інші відомі способи, з одержанням безклітинного фільтрату. Ферментативний бульйон або безклітинний фільтрат можна додатково концентрувати за допомогою методик, таких як, наприклад, ультрафільтрація, випарювання або осадження. Білкові компоненти надосадової рідини або фільтрату можна осаджувати за допомогою солі, наприклад, сульфату амонію, з наступним очищенням за допомогою різних традиційних методів очищення, таких як іонообмінна хроматографія, афінна

хроматографія або подібні традиційні методи.

[0071] Для зниження вмісту ДНК у білковому препараті, отриманому з грибів (наприклад, у білковому препараті з *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosus*, *F. venenatum* або *H. insolens*), рН та/або температуру білкового препарату коригують, зазвичай збільшують, для того, щоб збільшити активність ДНКаз гриба в препараті. рН перед етапом коригування зазвичай є незмінним порівняно з таким у ході ферментації. Температура перед етапом коригування зазвичай варіює в діапазоні від температури культивування до кімнатної температури залежно від того, як довго охолоджувався бульйон перед коригуванням температури, якщо це взагалі відбувалося. Білковий препарат згодом інкубують при скоригованих рН та/або температурі протягом періоду, достатнього для зменшення вмісту ДНК, яке можна виявити, і переважно зменшення вмісту ДНК до рівня, який неможливо виявити. У деяких способах коригування рН або температури полягає в збільшенні рН та/або температури з підвищенням стосовно значень, які застосовували у ферментації (як правило, рН 4,0-5,0 і температура 27-30°C). Комбінація підвищених значень рН і температури є ефективною, але не завжди необхідною. Наприклад, повного розпаду ДНК можна досягти із застосуванням тільки підвищеного рН, зберігаючи в той же час температуру білкового препарату низькою (наприклад, 10°C або 4°C) або підтримуючи її незмінною або відповідною до кімнатної температури (наприклад, температура в межах діапазону 4°C-27°C). Також можна забезпечити розпад ДНК із застосуванням тільки підвищеної температури, зберігаючи в той же час рН білкового препарату низьким (наприклад, рН 4-5) або підтримуючи його незмінним порівняно із застосуванням у ферментації. Активність ендогенної ДНКаз в білковому препараті, отриманому з грибів, можна виявити за допомогою аналізу, розкритого, наприклад, в Sinicropi, D., et al., (1994) Anal. Biochem. 222:351-358, або в Tolun, G. and Myers, R.S. (2003) Nucleic Acids Research 31: e111. Такий аналіз можна застосовувати для визначення рН та/або температури, оптимальних для активності ендогенної ДНКаз.

[0072] Підвищений рН для видалення ДНК може перебувати в діапазоні від 5,0 до 9,0 і переважно перебуває в діапазоні від 6,0 до 8,0. Деякі приклади діапазонів рН для видалення ДНК включають від 5,0 до 6,0, від 5,2 до 7,8, від 5,5 до 7,5, від 6,0 до 7,0, від 6,5 до 7,5, від 7,0 до 8,0 і від 8,0 до 9,0.

[0073] Підвищена температура для видалення ДНК може перебувати в діапазоні від 30°C до 70°C і переважно перебуває в діапазоні від 35°C до 47°C. Деякі приклади діапазонів температури для видалення ДНК включають від 30°C до 40°C, від 40°C до 50°C, від 50°C до 60°C і від 60°C до 70°C. Для термофільних або термостабільних білків, які експресуються рекомбінантним шляхом нитчастими грибами-хазяїнами (наприклад, *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosus*, *F. venenatum* або *H. insolens*), можна застосовувати вищу температуру. Термостабільність ДНКаз конкретного гриба-хазяїна також є визначальним чинником застосування такої вищої температури. Наприклад, така вища температура може бути не вищою за близько 66°C, такою як не вища за близько 60°C, 58°C, 55°C або 52°C.

[0074] Білковий препарат можна інкубувати при підвищеному рН у комбінації з різними діапазонами температури. Наприклад, рН можна підвищувати до діапазону від 5,2 до 7,8, від 5,5 до 7,5, від 5,5 до 6,5, від 6,5 до 7,5 або від 7,5 до 8,5 при температурі, яку підтримують в діапазоні від 0°C до 5°C, від 5°C до 15°C, від 15°C до 25°C, від 25°C до 35°C, від 35°C до 45°C або від 45°C до 55°C. Аналогічно, білковий препарат можна інкубувати при підвищеній температурі в комбінації з різними діапазонами рН. Наприклад, температуру можна підвищувати до діапазону від 25°C до 35°C, від 35°C до 45°C або від 45°C до 55°C при рН, який підтримують в діапазоні від 3,5 до 4,5, від 4,5 до 5,5, від 5,5 до 6,5, від 6,5 до 7,5 або від 7,5 до 8,5.

[0075] Якщо видалення ДНК за допомогою ДНКаз здійснюється в концентраті білка, отриманому шляхом ультрафільтрації, концентрат після ультрафільтрації зазвичай має кімнатну температуру. У цьому випадку температуру можна збільшувати вище за кімнатну температуру та/або рН можна збільшувати вище за рН, які застосовують у ферментації за участю грибів-хазяїнів.

[0076] Час інкубування для видалення ДНК у ході етапу коригування може значною мірою варіювати, частково залежно від бажаного ступеня зниження вмісту ДНК і чутливості бажаних білків до температури й рН, які застосовують для видалення ДНК. Видалення ДНК до рівня, який неможливо виявити, є переважним. Також переважною є невелика втрата активності бажаного білка (білків) або відсутність такої. Оптимізовані умови інкубування переважно зумовлюють відсутність втрати або незначну втрату стабільності або активності білка, наприклад, втрату активності бажаного білка (білків), що складає менше ніж 1 %, 2 %, 5 %, 10

10 %, 15 % або 20 %. Стабільність або активність білка можна необов'язково оцінювати перед інкубуванням та/або після нього. Період часу, необхідний для видалення ДНК під час інкубування, також залежить від рН та/або температури в ході видалення ДНК, при цьому, у міру того як рН опускається нижче за 7, а температура опускається нижче за 40°C, стає потрібно більше часу. Період часу зазвичай становить щонайменше 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240 хвилин і аж до 4, 6, 12, 24 або 48 годин, включаючи всі перестановки нижньої й верхньої меж. Час інкубування також може бути більшим за 48 годин. Переважний час інкубування становить 2-8 годин. Переважно, етап коригування рН та/або температури здійснюють перед тим, як фермент (ферменти), що вироблюється (вироблюються) клітиною-хазяїном, застосовують для обробки наміченого субстрату або впливу на нього.

[0077] Вміст ДНК у білковому препараті (наприклад, у культуральному бульйоні) можна також оцінювати перед етапами інкубування або коригування або після них. Будь-який сегмент ДНК гриба-хазяїна можна застосовувати як маркер загального вмісту ДНК у препараті. Переважно, застосовують сегмент генома. Можна необов'язково виявляти більше одного сегмента.

[0078] ПЛР-ампліфікація є придатним і переважним способом аналізу вмісту нуклеїнової кислоти (наприклад, ДНК). Праймери можуть призначатися для фланкування відповідного сегмента геномної ДНК (наприклад, повну геномну послідовність *T. reesei* можна отримати на веб-сайті Об'єднаного інституту генома Міністерства енергетики США, а повну геномну послідовність *Aspergillus* sp. можна отримати в базі даних стосовно генома *Aspergillus*, організованій школою медицини Мерілендського університету й кафедрою генетики школи медицини Стендфордського університету, а також на веб-сайті проекту "Fungal Genome Initiative" Інституту Брода). Виявлення за допомогою ПЛР може бути якісним або кількісним. Здійснюючи ампліфікацію з наступним виявленням продукту ампліфікації, за наявності такого, за допомогою забарвлення гелю бромистим етидієм, можна одержати свідчення про наявність або відсутність відповідного маркера, але при цьому не буде забезпечуватися точне вимірювання кількості такого маркера. Наявність ДНК також можна виявляти за допомогою гелю-електрофорезу та забарвлення бромистим етидієм без ПЛР-ампліфікації. ДНК показана за допомогою характерної плями або смуг ледера.

[0079] Під час кількісної ампліфікації кількість продукту ампліфікації є пропорційною кількості матриці у вихідному зразку, і виявлення відбувається в режимі реального часу. Порівняння з відповідними контрольними зразками забезпечує міру числа копій ампліфікованих сегментів ДНК. Докладні протоколи кількісної ПЛР наведені в Innis et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.

[0080] Інші способи ампліфікації, придатні для застосування у виявленні, включають лігасну ланцюгову реакцію (LCR) (див. Wu and Wallace (1989) Genomics 4: 560, Landegren et al. (1988) Science 241: 1077 і Barringer et al. (1990) Gene 89: 117), транскрипційну ампліфікацію (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173), самопідтримувану реплікацію послідовностей (Guatelli et (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874), точкову ПЛР і ПЛР із застосуванням лінкерів і адаптерів.

[0081] Наявність або рівень ДНК у білковому препараті (наприклад, у культуральному бульйоні) також можна оцінити за допомогою, наприклад, гібридизаційних аналізів. Способи, такі як Саузерн-блотинг, описані, наприклад, в Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d Ed., vols 1-3, Cold Spring Harbor Press, New York). Також доступні комерційні набори для аналізу ДНК, такі як набір для аналізу ДНК Quant-iT™, що постачається InVivoGen Corporation (Карлсбад, Каліфорнія).

[0082] Обробка бульйону або іншого білкового препарату за допомогою способів за даним винаходом зумовлює зниження вмісту ДНК, що можна виявити, і переважно вміст ДНК знижується до рівня, що неможливо виявити. Вважають, що рівень неможливо виявити, якщо ПЛР-ампліфікація будь-якого сегмента геномної ДНК, присутнього в гаплоїдному геномі як одна копія, з подальшим забарвленням бромистим етидієм не дає видимої полоси (у разі застосування умов ПЛР, описаних в даних Прикладах). У прикладі типової нормативної вимоги у "відсутності ДНК, яку можна виявити в кінцевому продукті" можна пересвідчитися за допомогою аналізу на основі ПЛР із межею виявлення, що становить, наприклад, 1-5 нг загальної ДНК нитчастих грибів/мл ферментного препарату. В іншому прикладі можна встановити межі виявлення загальної ДНК нитчастих грибів, що становлять 20 пг/мл, або 2 нг/мл, або 10 нг/мл, залежно від форми складу та/або застосування кінцевого продукту. У певних інших прикладах за допомогою способу за даним винаходом, наприклад, шляхом збільшення часу інкубування при підвищеній температурі та/або при підвищеному рН можна досягти ще більш низької межі, яка становить близько 500 фемтограмів загальної ДНК нитчастих грибів/г ліофілізованого

продукту (наприклад, менше ніж близько 450 фг ДНК на г ліофілізованого продукту, менше ніж близько 400 фг/г, менше ніж близько 350 фг/г, менше ніж близько 300 фг/г, менше ніж близько 250 фг/г або навіть менше ніж близько 200 фг/г). На додаток, також передбачається застосування даного способу в комбінації із традиційними способами видалення ДНК з культуральних бульйонів або інших білкових препаратів. Наприклад, описаний у даному документі спосіб можна застосовувати для зниження рівня ДНК у культуральному бульйоні з наступним додаванням невеликих кількостей екзогенної ДНКаз для того, щоб додатково видалити залишкову ДНК з такого бульйону за умови, що внесок такої екзогенної ДНКаз в розпад становить не більше 49 % (наприклад, не більше 49 %, не більше 45 %, не більше 40 %, не більше 35 %, не більше 30 %, не більше 25 %, не більше 20 %, не більше 15 %, не більше 10 % або не більше 5 %) загальної активності ДНКаз.

[0083] Після видалення ДНК з білкового препарату (у тому числі, наприклад, з культурального бульйону) може бути надана можливість падіння температури у випадку, якщо вона була підвищеною в ході видалення ДНК, до нижчої температури, наприклад, до кімнатної температури, або охолодження до нижчої температури, що становить 4°C, або іншої температури, придатної для зберігання препарату. Повторне коригування рН препарату до іншого значення зазвичай не є необхідним. Однак, якщо подальше складання або інші процедури вимагають конкретного значення рН, то рН препарату можна відкоригувати до бажаного значення.

[0084] Оскільки можна очікувати на те, що продукти ферментації або бульйон, у якому містяться інші рекомбінантні клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів, мають активність ендогенної ДНКаз на деякому рівні, так само, як і культуральний бульйон, у якому міститься *T. reesei*, спосіб, описаний у даному документі, можна так само застосовувати для видалення ДНК з таких бульйонів або інших білкових препаратів. Оскільки можна очікувати на те, що рівень активності ДНКаз та рН або температура, оптимальні для ендогенних ДНКаз, можуть варіювати серед видів, фахівців у даній галузі може встановити коригування рН та/або коригування температури, а також період інкубування, необхідний для видалення молекул ДНК, застосовуючи ідеї, викладені в даному документі, без широкого експериментування.

V. Складання

[0085] Після розпаду ДНК гриба-хазяїна в білковому препараті (у тому числі, наприклад, у культуральному бульйоні) препарат можна впакувати для продажу або застосовувати по суті як є з мінімальною додатковою переробкою або без такої, або білковий препарат можна додатково очищувати або в інший спосіб переробляти та/або складати для подальших шляхів застосування. Білок (білки) або білкові препарати можна складати, наприклад, у формі рідини, рідкої маси, порошку, розпорошеного розчину, суспензії, ліофілізованої композиції/складу, твердої речовини, гранули, таблетки з желатиною оболонкою, пігулки, імплантату, гелю або у формі фармацевтичного складу, харчів, корму, харчової біологічно активної добавки, кормової біологічно активної добавки, харчової добавки, кормової добавки, поживної добавки або дієтичної добавки до них.

VI. Шляхи застосування білків

[0086] Білок (білки) або білкові препарати (наприклад, бульйон), отримані за допомогою способів за даним винаходом, мають шляхи застосування в сільському господарстві, промисловості, медицині та харчуванні. Наприклад, ферменти целюлази можна застосовувати для одержання глюкози із зерна або як біологічно активну добавку до корму тварин для зменшення утворення фекальних відходів життєдіяльності шляхом збільшення перетравлюваності корму. Ферменти целюлази також можна застосовувати для збільшення ефективності спиртового бродіння (наприклад, у пивоварстві) шляхом конверсії лігноцелюлозної біомаси в цукри, які ферментуються. Препарат фітази можна застосовувати в мокрому помелі зерна, кормах для тварин та чистильних засобах. Фітази, фітати й похідні фітатів, що є нижчими фосфатами, також знаходять багато інших шляхів застосування в засобах особистої гігієни, медичних продуктах і харчових і поживних продуктах, а також у різних шляхах застосування в промисловості, зокрема, в галузі очищення, текстильної промисловості, літографічного друку та хімії. Ліпази можна застосовувати в різних шляхах застосування, пов'язаних з харчами/кормом, випіканням, очищенням та/або біологічним паливом. Білки, такі як гормони, фактори росту, цитокіни й антитіла, можна застосовувати в лікуванні й профілактиці захворювань.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Частина А

[0087] Рекомбінантний штам *T. reesei*, що експресує фітазу *Buttiauxella* sp., культивували в

біореакторі. Касету експресії, що виробляє фітазу, одержували відповідно до протоколів, описаних у публікації патенту США US2009/0098249. Касету експресії згодом вводили в штам-хазяїн, отриманий з варіанта "з делецією у чотирьох генах" (де в генах чотирьох основних секретованих целюлаз CBHI (cel7a), CBHII (cel6a), EGI (cel7b), EGII (cel5a) відбулися делеції) штаму RL-P37 T. reesei (Sheir-Neiss and Montenecourt, 1984, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:46-53). Біореактор експлуатували відповідно до описаного в публікації патенту US20040121446 (відповідне розкриття якої включено в даний документ за допомогою посилання).

[0088] Після росту в біореакторі надосадову рідину культури одержували шляхом фільтрації для видалення клітин T. reesei. Надосадову рідину концентрували приблизно в чотири рази шляхом ультрафільтрації. Як бензоат натрію, так і сорбат калію додавали до кінцевої концентрації 0,3 %, і pH коригували до 5,5, забезпечуючи концентрат, отриманий шляхом ультрафільтрації (UFC), який застосовували в описаних нижче експериментах.

[0089] Фрагмент ДНК розміром 1526 п.о. (стандартна добавка ДНК) одержували за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і очищували за допомогою набору для очищення продуктів ПЛР від Qiagen (Валенсія, Каліфорнія) згідно з інструкціями виробника. Цю стандартну добавку ДНК додавали до зразків UFC із кінцевою концентрацією 1 мкг/мл. Олігонуклеотидні праймери, які застосовують в ПЛР, можна застосовувати для утворення такого ж фрагмента ДНК, застосовуючи як матрицю або геномну ДНК штаму T. reesei, який вирощують в біореакторі, або очищену плазмідну ДНК, що містить таку саму послідовність ДНК-матриці. ДНК-послідовність стандартної добавки ДНК не є важливою. Будь-яку ділянку геномної ДНК T. reesei можна застосовувати як матрицю, а праймери можна розробити за допомогою традиційних методів.

[0090] Метод тестування наявності ДНК хазяїна в зразках UFC полягає в наступному: ДНК очищували з 50 мкл зразків UFC (до яких за необхідності додавали стандартну добавку препарату ДНК) за допомогою набору Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System від Promega (Медісон, Вісконсин) згідно з інструкціями виробника. Коротко, 50 мкл зразка UFC змішували з 450 мкл розчину для зв'язування з мембранами від Promega і цю суміш завантажували в мініколонку Wizard SV. Після промивання мініколонки за допомогою розчину для промивання мембран будь-яку ДНК, що зв'язалася з мембраною мініколонки, зрештою елюювали водою, що не містить нуклеаз. Виявлення ДНК в елюйованому зразку здійснювали за допомогою ПЛР, застосовуючи ті самі праймери, які застосовували для утворення стандартної добавки ДНК, з наступною візуалізацією фрагментів ДНК за допомогою електрофорезу в агарозному гелі та забарвлення бромистим етидієм. У продуктах ПЛР часто спостерігали дві смуги ДНК, імовірно у зв'язку з деяким неспецифічним зв'язуванням праймерів.

Частина В

[0091] Зразок UFC, що містить ДНК, яку можна виявити, вибирали за допомогою аналізу за методом ПЛР без додавання стандартної добавки ДНК (фігура 1, доріжка 1). До цього UFC додавали стандартну добавку ДНК до кінцевої концентрації 1 мкг/мл, і було видно, що кількість отриманого продукту ПЛР збільшувалася (фігура 1, доріжка 2). UFC (без стандартної добавки ДНК) доводили до pH 3,0, pH 4,5 або pH 7,0 та інкубували при 10°C протягом 1 години. ДНК залишалася такою, що можна виявити за допомогою аналізу за методом ПЛР, після інкубування при pH 3,0 і pH 4,5, але не після інкубування при pH 7,0. UFC (без стандартної добавки ДНК) доводили до pH 4,5 або pH 7,0 та інкубували при 40°C протягом 24 годин, після чого ДНК не можна було виявити за допомогою аналізу за методом ПЛР.

Частина С

[0092] До зразка UFC при pH 5,5 додавали стандартну добавку ДНК із кінцевою концентрацією 1 мкг/мл. Зразок інкубували при 40°C протягом 0, 4, 8, 12, 24 або 48 годин. Без інкубування стандартну добавку ДНК можна було виявити за допомогою аналізу за методом ПЛР (фігура 2, доріжка 1). Однак після 4 годин інкубування стандартну добавку ДНК більше не можна було виявити (фігура 2, доріжка 2). Під час інкубування впродовж до 24 годин втрату активності фітази не спостерігали. Такий самий зразок UFC зі стандартною добавкою ДНК інкубували протягом 7 днів при 4°C або кімнатній температурі, після чого ДНК не можна було виявити за допомогою аналізу за методом ПЛР (фігура 2, доріжки 7 і 8).

Частина D

[0093] До зразка UFC при pH 5,5 додавали стандартну добавку ДНК із кінцевою концентрацією 1,45 мкг/мл. Зразок інкубували при 10°C, або 22°C, або 37°C протягом 0, 4, 8, 12 або 24 годин з наступним аналізом за методом ПЛР для виявлення стандартної добавки ДНК.

[0094] Після інкубування протягом 8 годин при 10°C ДНК можна було виявити за допомогою ПЛР (фігура 3, доріжка 4), і навіть через 24 години при 10°C спостерігали слідові кількості продукту ПЛР (фігура 3, доріжка 5). Після інкубування протягом 8 годин при 22°C ДНК можна

було виявити за допомогою ПЛР (фігура 3, доріжка 9), але після 24 годин при 22°C продукт ПЛР не спостерігали (фігура 3, доріжка 10). Після інкубування протягом 2 або 4 годин при 37°C спостерігали слідові кількості продукту ПЛР (фігура 3, доріжки 12 і 13), але після 8 годин при 37°C ДНК не виявляли (фігура 3, доріжка 14). У контрольному експерименті, що включає стандартну добавку ДНК у воді, було чітко показано, що ДНК виявляється після інкубування протягом 24 годин при 37°C, що підтвердило, що втрата ДНК була зумовлена компонентами UFC (фігура 3, доріжка 16).

Приклад 2

[0095] Рекомбінантний штам *T. reesei*, що експресує ліпазу *Aspergillus tubingensis*, культивували в біореакторі. Касету експресії, що виробляє ліпазу, одержували відповідно до протоколів, описаних у публікації патенту США WO 2010/122531. Касету експресії згодом уводили в штам-хазяїн, отриманий з варіанта "з делецією у чотирьох генах" (де в генах чотирьох основних секретованих целюлаз CBHI (*cel7a*), CBHII (*cel6a*), EGI (*cel7b*), EGII (*cel5a*) відбулися делеції) штаму RL-P37 *T. reesei* (Sheir-Neiss and Montenecourt, 1984, Appl. Microbiol. Biotechnol. 20:46-53). Біореактор експлуатували відповідно до описаного в публікації патенту US20040121446 (відповідне розкриття якої включено в даний документ за допомогою посилання).

[0096] Після росту в біореакторі надосадову рідину культури одержували шляхом фільтрації для видалення клітин *T. reesei*. Надосадову рідину концентрували приблизно в чотири рази шляхом ультрафільтрації з утворенням концентрату, отриманого шляхом ультрафільтрації (UFC), який застосовували в подальших експериментах.

[0097] Для екстракції ДНК зі зразків UFC застосовували набір Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System від Promega (Медісон, Вісконсин) згідно із вказівками виробника. Коротко, 100 мкл зразка UFC змішували з 450 мкл розчину для зв'язування з мембранами від Promega, і цю суміш завантажували в мініколонку Wizard SV. Після промивання мініколонки за допомогою розчину для промивання мембран будь-яку ДНК, що зв'язалася з мембраною мініколонки, зрештою елюювали водою, що не містить нуклеаз. Виявлення ДНК в елюйованому зразку здійснювали за допомогою електрофорезу в агарозному гелі й забарвлення бромистим етидієм. У зразках UFC часто спостерігали пляму, що відповідає фрагментам ДНК з низькою молекулярною вагою (приблизно 300 п.о. і менше), і вони ймовірно були отримані з фрагментованої геномної ДНК *T. reesei*.

[0098] Тестували різні методи обробки UFC і спостерігали їхні ефекти стосовно відносної кількості ДНК, витягненої з UFC. Вихідне значення pH UFC становило приблизно 4,0 (контрольний UFC). Коригували pH зразків UFC до 5,2, 6,3 або 7,6. Контрольний UFC і UFC зі скоригованими значеннями заморожували безпосередньо після коригування pH або інкубували протягом 24 годин при 4°C або при кімнатній температурі та заморожували до проведення подальшого аналізу. Усі зразки згодом аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі. Результати показано на фігурах 4A і 4B. Інкубування контрольного UFC або UFC з pH, скоригованим до 5,2, не чинило явного ефекту стосовно наявності ДНК. Інкубування UFC з pH, скоригованим до 6,3, викликало невелике зниження вмісту ДНК. Інкубування UFC з pH, скоригованим до 7,6, викликало явне зниження вмісту ДНК, так що після 24 годин при кімнатній температурі пляму ДНК не можна було виявити за допомогою електрофорезу в агарозному гелі.

[0099] Усі патенти й публікації, у тому числі всі послідовності, розкриті в цих патентах і публікаціях, про які йдеться в даному документі, у явній формі включені за допомогою посилання у всій своїй повноті всіма сторонами. Хоча були описані переважні способи й матеріали, будь-які способи й матеріали, подібні до описаних у даному документі або еквівалентні їм, можна застосовувати під час практичного здійснення або тестування даного винаходу. Якщо з контексту явно не випливає інше, будь-який варіант здійснення, аспект, етап, ознаку, елемент або обмеження можна застосовувати в комбінації з будь-яким іншим.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб зниження вмісту ДНК у бульйоні, у якому культивували клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів, який включає наступні етапи:

коригування pH і/або температури бульйону, у якому культивували грибні клітини-хазяїни протягом щонайменше 24 годин, зі збільшенням pH і/або температури, застосовуваних у культивуванні; та

інкубування бульйону при збільшених pH та/або температурі протягом періоду, достатнього для зниження вмісту ДНК грибів-хазяїнів у препараті, яке піддається виявленню;

за умови, що зниження вмісту ДНК переважно не зумовлене наявністю екзогенної ДНКази в бульйоні.

2. Спосіб за п. 1, який додатково включає здійснення етапу розділення рідкої і твердої фази для відділення бульйону від клітин-хазяїнів, які є клітинами нитчастих грибів, перед етапом коригування.

3. Спосіб за п. 1, який додатково включає етап ультрафільтрації, який **відрізняється** тим, що макромолекули в бульйоні концентрують шляхом здійснення ультрафільтрації перед етапом коригування.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що бульйон має кімнатну температуру після етапу ультрафільтрації.

5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що температура бульйону перед етапом коригування становить від 25 °C до 34 °C.

6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що рН бульйону перед етапом коригування становить від 4 до 5.

7. Спосіб за п. 1, який додатково включає культивування клітин-хазяїнів, що є клітинами нитчастих грибів, у бульйоні до досягнення бажаної концентрації секретованих білків, які становлять інтерес, у бульйоні перед етапом коригування.

8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що рН збільшують до рН 6-8 під час етапу коригування.

9. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що температуру збільшують до 35-47 °C під час етапу коригування.

10. Спосіб за п. 1, який додатково включає оцінювання вмісту ДНК у бульйоні.

11. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вміст ДНК оцінюють перед етапом інкубування та після нього.

12. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що вміст ДНК знижують до рівня, який неможливо виявити, що оцінюють за допомогою ПЛР та/або гель-електрофорезу із забарвленням бромистим етидієм.

13. Спосіб за п. 1, який додатково включає надання можливості бульйону охолонути до кімнатної температури після етапу інкубування.

14. Спосіб за п. 1, який додатково включає очищення одного або декількох білків з бульйону.

15. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн, яка є клітиною нитчастого гриба, експресує один або кілька білків у бульйоні рекомбінантним шляхом.

16. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що в клітині-хазяїні, яка є клітиною нитчастого гриба, відсутня екзогенна ДНКаза.

17. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що в бульйон не додають ДНКазу.

18. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн, яка є клітиною нитчастого гриба, експресує фермент целюлазу рекомбінантним шляхом.

19. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн, яка є клітиною нитчастого гриба, експресує фітазу рекомбінантним шляхом.

20. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн, яка є клітиною нитчастого гриба, експресує ліпазу рекомбінантним шляхом.

21. Спосіб зниження вмісту ДНК у білковому препараті, отриманому з клітин-хазяїнів, які є клітинами нитчастих грибів, який включає наступні етапи:

оцінювання рівня ДНК клітин-хазяїнів, які є клітинами нитчастих грибів, у білковому препараті, отриманому з грибних клітин-хазяїнів;

підвищення рН і/або температури білкового препарату;

інкубування білкового препарату при підвищених рН і/або температурі протягом періоду, достатнього для зниження рівня ДНК клітин-хазяїнів, які є клітинами нитчастих грибів, у білковому препараті, яке піддається виявленню; та

визначення зниження кількості ДНК клітин-хазяїнів, які є клітинами нитчастих грибів, у білковому препараті;

за умови, що зниження переважно не зумовлене наявністю екзогенної ДНКази в білковому препараті.

22. Спосіб за п. 21, який **відрізняється** тим, що кількість ДНК знижують до рівня, який неможливо виявити.

23. Спосіб зниження вмісту ДНК у бульйоні, у якому культивували клітини-хазяїни, що є клітинами нитчастих грибів, який включає наступні етапи:

збільшення рН та/або температури бульйону, у якому культивували клітини-хазяїни, які є клітинами нитчастих грибів, протягом щонайменше 24 годин і в якому здійснювали етап

розділення рідкої і твердої фази для відділення бульйону від клітин-хазяїнів, які є клітинами нитчастих грибів; та

інкубування бульйону при збільшених рН і/або температурі протягом періоду, достатнього для зниження вмісту ДНК нитчастих грибів-хазяїнів у бульйоні, яке піддається виявленню;

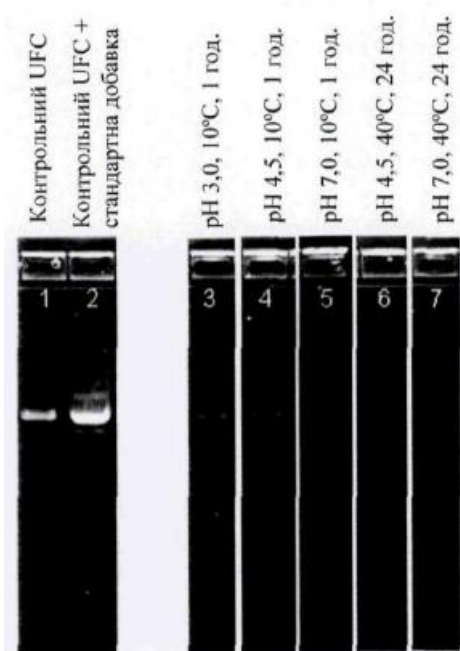
5 за умови, що зниження переважно не зумовлене наявністю екзогенної ДНКази в бульйоні.

24. Спосіб за будь-яким з пп. 1, 21 і 23, який **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн, яка є клітиною нитчастого гриба, являє собою клітину *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum* або *H. insolens*.

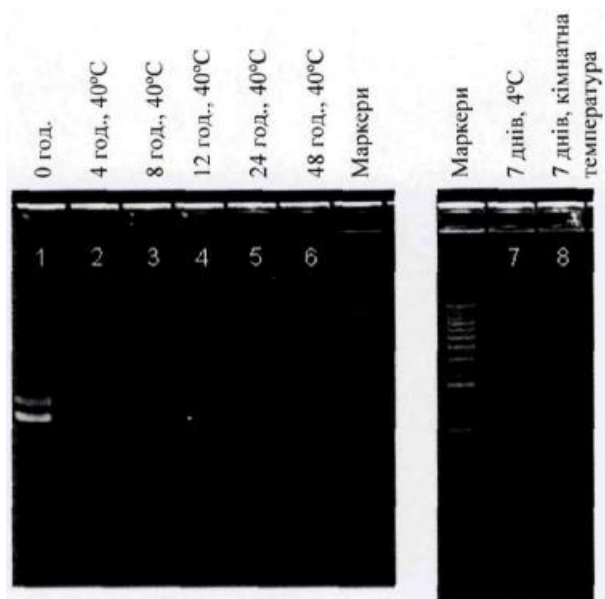
10 25. Застосування активності ендогенної ДНКази клітини-хазяїна, яка є клітиною нитчастого гриба, для зниження вмісту ДНК нитчастих грибів-хазяїнів у білковому препараті, отриманому з клітини-хазяїна, яка є клітиною нитчастого гриба.

26. Застосування активності ендогенної ДНКази клітини-хазяїна, яка є клітиною нитчастого гриба, для зниження вмісту ДНК нитчастих грибів-хазяїнів у культуральному бульйоні, у якому культивували клітину-хазяїна, яка є клітиною нитчастого гриба.

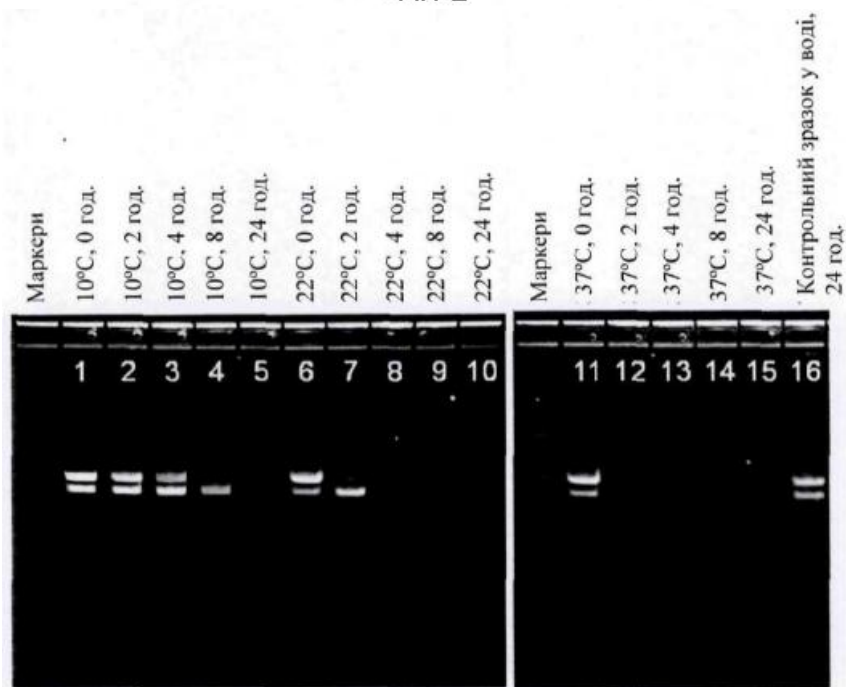
15 27. Застосування за п. 25 або п. 26, яке **відрізняється** тим, що клітина-хазяїн, яка є клітиною нитчастого гриба, являє собою клітину *T. reesei*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. oryzae*, *G. emersonii*, *M. thermophila*, *P. funiculosum*, *F. venenatum* або *H. insolens*.



Фіг. 1



Фіг. 2



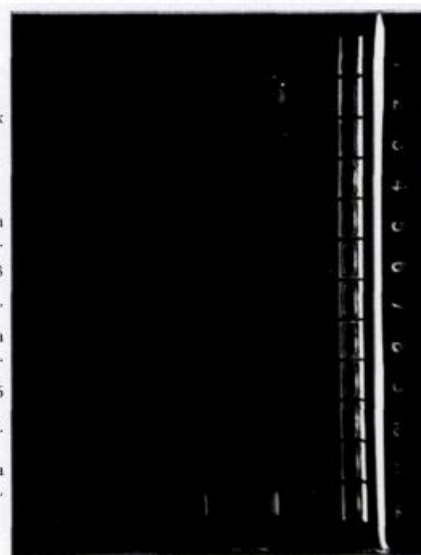
Фіг. 3

Контрольний зразок
 Контрольний зразок, 4°C, 24 год.
 Контрольний зразок, кімнатна температура, 24 год.
 pH 5,2
 pH 5,2, 4°C, 24 год.
 pH 5,2, кімнатна температура, 24 год.
 pH 6,3
 pH 6,3, 4°C, 24 год.
 pH 6,3, кімнатна температура, 24 год.



Фіг. 4А

Контрольний зразок
 Контрольний зразок, 4°C, 24 год.
 Контрольний зразок, кімнатна температура, 24 год.
 pH 6,3
 pH 6,3, 4°C, 24 год.
 pH 6,3, кімнатна температура, 24 год.
 pH 7,6
 pH 7,6, 4°C, 24 год.
 pH 7,6, кімнатна температура, 24 год.



Фіг. 4В

Комп'ютерна верстка О. Рябко

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601