



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2012105621/10, 30.08.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
01.09.2009 US 61/275,675

(43) Дата публикации заявки: 10.10.2013 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 02.04.2012(86) Заявка РСТ:  
US 2010/047183 (30.08.2010)(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2011/028668 (10.03.2011)Адрес для переписки:  
190000, Санкт-Петербург, ВОХ-1125,  
ПАТЕНТИКА

(71) Заявитель(и):

**РЕНССЕЛЭЕР ПОЛИТЕКНИК  
ИНСТИТЮТ (US)**

(72) Автор(ы):

**ВАН Чжэньюй (US),  
ЛИНХАРД Роберт Дж. (US),  
ДОРДИК Джонатан С. (US),  
БХАСКАР Уджвал (US)**(54) **ФЕРМЕНТАЦИЯ И ОЧИСТКА ГЕПАРОСАНА K5**

(57) Формула изобретения

1. Способ получения по существу чистого гепаросана из *E.coli* K5, включающий:
- (а) культивирование клеток *E.coli* K5 в заданной среде, содержащей глюкозу в качестве основного источника углерода,
  - (б) осуществление связывания гепаросана с твердофазным носителем с последующим элюированием и
  - (в) осаждение гепаросана из элюата;
- при этом указанный по существу чистый гепаросан является по меньшей мере на 90% чистым.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что культивирование включает фазу периодического культивирования и фазу периодического культивирования с подпиткой, при этом
- (а) среда, применяемая на стадии периодического культивирования, содержит (на литр) примерно 20 г глюкозы, 10-300 мг тиамин, примерно 13,5 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , примерно 4,0 г  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  примерно 1,4 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , примерно 1,7 г лимонной кислоты, и примерно 10,0 мл раствора микроэлементов, при этом раствор микроэлементов по существу состоит из (на 1 л 5М HCl) 10,0 г  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2,0 г  $\text{CaCl}_2$ , 2,2 г  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 г  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 г  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  и 0,02 г  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  и при этом;

(б) среда для подпитки, применяемая на стадии периодического культивирования с подпиткой, содержит (на литр): 250-1000 г глюкозы, 20 г  $MgSO_4$ , 0,15-0,5 г тиамин, и возможно 47 г  $KH_2PO_4$  и

(в) при этом снабжение кислородом осуществляют путем барботирования воздуха с дополнительной подачей или без дополнительной подачи кислорода.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что содержание растворенного кислорода поддерживают на уровне примерно 20%.

4. Способ по п.2, отличающийся тем, что температуру поддерживают на уровне примерно  $37^{\circ}C$ , а рН поддерживают на уровне примерно 7.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что рН поддерживают путем добавления 29%-ным раствором аммиака.

6. Способ по п.2, отличающийся тем, что среду, применяемую на стадии периодического культивирования с подпиткой, подают со скоростью, определяемой по формуле:

$$M_S(t) = F(t)S_{F(t)} = \left( \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) X(t_0)V(t_0)\exp[\mu(t - t_0)],$$

где  $M_S$  представляет собой скорость потока источника углерода (г/ч),  $F$  - скорость подачи раствора для подпитки (л/ч);  $S_F$  представляет собой концентрацию источника углерода в подпитке (г/л);  $X$  - концентрация клеток (г/л с.м.к.),  $m$  - удельный коэффициент поддержания (г/г DCW/ч),  $V$  - объем культуры (л);  $t_0$  - время начала подпитки;  $t$  - время процесса;  $\mu$  - удельная скорость роста ( $ч^{-1}$ ) и  $Y_{X/S}$  - выход клеток на количество источника углерода (г/г).

7. Способ по п.2, отличающийся тем, что выход гепаросана составляет более 12 г/л супернатанта культуры.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что ферментацию проводят в течение менее 48 ч, без учета роста стартовой культуры.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия осуществления связывания и элюирования включает (I) удаление клеток, (II) смешивание анионной смолы с супернатантом культуры и удаление супернатанта, (III) промывку смолы с помощью 50 мМ хлорида натрия в натрий-ацетатном буфере при рН 4, (IV) элюирование 1 М хлорида натрия в натрий-ацетатном буфере при рН 4.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что стадия осуществления связывания и элюирования включает (I) удаление клеток, (II) смешивание раствора хитозана с супернатантом культуры, (III) осаждение хитозана и выделение осадка; (III) промывку хитозана. (IV) элюирование гепаросана с помощью примерно 1 М раствора NaOH.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что осаждение гепаросана из элюата включает осаждение с помощью этанола.

12. Способ по п.1, дополнительно включающий депирогенизацию с помощью перекиси водорода.

13. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный гепаросан содержит менее 1% ДНК и менее 2% белка.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный гепаросан имеет среднечисленный молекулярный вес примерно 58000 Да, средневесовой молекулярный вес 84000 Да и индекс полидисперсности (ИПД) примерно 1,4.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный гепаросан является по меньшей мере на 95% чистым.

16. Гепаросан, полученный с помощью способа по любому из пп.1-15.
17. Гепарин, изготовленный из гепаросана по п.16.
18. Применение гепаросана, полученного с помощью способа по любому из пп.1-15.

RU 2012105621 A

RU 2012105621 A