



## Оптимизация метода рефолдинга Fc-слитого белка, полученного в бактериальной системе экспрессии

П. С. Астрелина✉, С. А. Ищук, А. В. Кабанова, Р. В. Драй

Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, поселок Стрельна, ул. Связи, д. 34, литера А

✉ **Контактное лицо:** Астрелина Полина Сергеевна. **E-mail:** Polina.Astrelina@gropharm.com

**ORCID:** П. С. Астрелина – <https://orcid.org/0000-0002-7984-1253>;

С. А. Ищук – <https://orcid.org/0000-0002-5754-7491>;

А. В. Кабанова – <https://orcid.org/0009-0007-0648-6354>;

Р. В. Драй – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

**Статья поступила:** 06.08.2024

**Статья принята в печать:** 06.02.2025

**Статья опубликована:** 07.02.2025

### Резюме

**Введение.** Производство Fc-слитых белков в прокариотических системах приводит к образованию нерастворимых агрегатов из-за неправильного сворачивания полипептидных цепей. Для получения функциональных белков требуется стадия рефолдинга, процесс подбора условий которого может быть трудоемким. Оптимизация параметров ренатурации с помощью подхода дизайнера эксперимента (Design of Experiments, DoE) позволяет рассчитать оптимальные параметры процесса и оценить влияние факторов и их взаимодействий.

**Цель.** Оценка влияния концентраций окислителя, восстановителя и pH буфера ренатурации на эффективность рефолдинга Fc-слитого белка *in vitro* и определение оптимальных условий.

**Материалы и методы.** В работе использовали тельца включения Fc-слитого белка, полученные в бактериальной системе экспрессии *Escherichia coli* BL21. Планирование эксперимента осуществляли с помощью ортогонального композиционного дизайна (Orthogonal Central Composite design, CCO). Дизайн эксперимента, статистическую обработку данных и оптимизацию параметров производили в программе MODDE (v. 12.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Германия). В качестве откликов использовали показатели хроматографической чистоты и выход целевого белка по данным высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии.

**Результаты и обсуждение.** Проведена оптимизация условий ренатурации Fc-слитого белка с применением подхода DoE. На основании полученных данных были построены графики поверхности откликов и определены оптимальные значения параметров pH буферной среды, концентрации окислителя и восстановителя. Полученные статистические модели демонстрируют высокую прогностическую способность и воспроизводимость данных. Была проведена успешная валидация процесса рефолдинга в оптимизированных условиях. Наблюдалось снижение количества высокомолекулярных примесей и неправильно свернутых форм белка в целевом продукте. Значение хроматографической чистоты целевого белка по данным высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии удалось повысить более чем на 10 %.

**Заключение.** Было установлено значительное влияние pH буферного раствора, соотношения концентраций окислительно-восстановительной пары и их взаимное влияние на выход и хроматографическую чистоту Fc-слитого белка. Показана тесная взаимосвязь эффектов окислительного и восстановительного компонентов с pH раствора. Повышенный pH буферной среды улучшает растворимость белка, что создает лучшие условия для правильного сворачивания полипептидной цепи.

**Ключевые слова:** рефолдинг, Fc-слитый белок, дизайн эксперимента, методология поверхности отклика

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** П. С. Астрелина – планирование и проведение эксперимента, анализ данных, интерпретация результатов, написание текста рукописи. С. А. Ищук – планирование эксперимента, редактирование текста, интерпретация результатов. А. В. Кабанова – анализ образцов методом высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии. Р. В. Драй – утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

**Финансирование.** Спонсор данного исследования – ООО «ГЕРОФАРМ».

**Для цитирования:** Астрелина П. С., Ищук С. А., Кабанова А. В., Драи Р. В. Оптимизация метода рефолдинга Fc-слитого белка, полученного в бактериальной системе экспрессии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(1):92–102. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1889>

## Optimization of the Fc-fusion protein refolding method produced from the bacterial expression system

Polina S. Astrelina✉, Sergey A. Ishchuk, Alyona V. Kabanova, Roman V. Drai

JSC "Pharm-Holding". 34A, Svyazi str., Strelna village, Saint-Petersburg, 198515, Russia

✉ **Corresponding author:** Polina S. Astrelina. **E-mail:** Polina.Astrelina@geropharm.com

**ORCID:** Polina S. Astrelina – <https://orcid.org/0000-0002-7984-1253>;  
Sergey A. Ishchuk – <https://orcid.org/0000-0002-5754-7491>;  
Alyona V. Kabanova – <https://orcid.org/0009-0007-0648-6354>;  
Roman V. Drai – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

**Received:** 06.08.2024

**Accepted:** 06.02.2025

**Published:** 07.02.2025

### Abstract

**Introduction.** The production of Fc-fused proteins in prokaryotic systems often results in the formation of insoluble aggregates due to improper folding of polypeptide chains. To obtain functional proteins, a refolding step is required. However, developing refolding parameters can be time-consuming. The optimization of renaturation conditions using the Design of Experiments (DoE) approach allows for the calculation of optimal process parameters and the evaluation of contributing factors and their interactions.

**Aim.** This study aims to evaluate the effects of denaturation buffer pH, as well as oxidative and reducing agent concentrations, on the efficiency of Fc-fusion protein refolding *in vitro* and to determine optimal refolding parameters.

**Materials and methods.** Fc-fusion protein inclusion bodies were obtained from an *Escherichia coli* BL21 bacterial expression system. The experiment was designed using an orthogonal composite design (Orthogonal Central Composite Design, CCO). Experimental design, statistical data processing, and parameter optimization were conducted using MODDE (v. 12.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Germany). Chromatographic purity and yield of the target protein, as determined by high-performance size-exclusion chromatography, were used as response variables.

**Results and discussion.** The DoE approach successfully optimized the Fc-fusion protein refolding process. Response surface plots were constructed, and the optimal factor values were determined. The statistical models demonstrated high predictive accuracy and data reproducibility. The refolding process was successfully validated under optimized conditions, resulting in a decrease in high-molecular-weight impurities and improperly folded protein forms. The chromatographic purity of the target protein increased by more than 10 %, as confirmed by high-performance size-exclusion chromatography.

**Conclusion.** The study established significant effects of buffer pH, redox pair concentrations, and their interactions on the yield and chromatographic purity of the Fc-fused protein. The interplay between oxidative and reducing components and buffer pH was demonstrated. Increasing the buffer pH led to improved refolding efficiency.

**Keywords:** refolding, Fc-fused protein, Design of Experiments, Response Surface Methodology

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Polina S. Astrelina – planning and conducting the experiment, data analysis, interpretation of results, writing the manuscript. Sergey A. Ishchuk – experiment planning, text editing, interpretation results. Alyona V. Kabanova – analysis of samples using high-performance liquid exclusion chromatography. Roman V. Drai – approval of the final version of the article for publication.

**Funding.** The sponsor of this study is LLC "GEROPHARM".

**For citation:** Astrelina P. S., Ishchuk S. A., Kabanova A. V., Drai R. V. Optimization of the Fc-fusion protein refolding method produced from the bacterial expression system. *Drug development & registration*. 2025;14(1):92–102. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-1-1889>

## ВВЕДЕНИЕ

В последние годы исследования терапевтического потенциала Fc-слитых белков представляют особый интерес, так как лекарственные препараты на основе платформы Fc-fusion демонстрируют эффективность в отношении многих хронических и врожденных заболеваний [1, 2]. Рекомбинантная молекулярная конструкция, полученная в результате слияния Fc-домена иммуноглобулина G с пептидом интереса, обеспечивает молекуле увеличенный период полураспада, что значительно продлевает терапевтическое действие препарата [3].

Для наработки Fc-слитых белков часто используются прокариотические системы экспрессии, такие как *E. coli*, ввиду простоты их культивирования. Однако из-за отсутствия необходимых посттрансляционных модификаций синтез продукта осуществляется в виде нерастворимых агрегатов – телец включения [4]. Такие образования являются результатом мисфолдинга – неправильного сворачивания полипептидной цепи [5]. Для биофармацевтического производства крайне важно в процессе выделения и очистки снизить количество нецелевых форм белка в готовом продукте, так как они не имеют должной биологической активности, а также могут обладать иммуногенными свойствами [6]. Это обуславливает необходимость введения дополнительной технологической стадии – рефолдинга белка.

Функциональная трехмерная структура белка определяется исключительно его аминокислотной последовательностью [7, 8]. Сворачивание происходит спонтанно, начиная с образования локальных вторичных структур, сопровождающегося уплотнением молекулы. Элементы вторичной структуры впоследствии взаимодействуют, образуя подобласти и домены, стабилизированные третичными взаимодействиями [9]. Наличие дисульфидной связи в нативной структуре белка имеет важное значение для формирования его третичной структуры, поэтому образование нецелевых S—S между аминокислотными остатками цистеинов может способствовать образованию молекул с некорректной конформацией в бактериальных системах экспрессии [10].

**Разработка условий рефолдинга** – нетривиальная задача. В промышленном масштабе самым простым и наиболее часто используемым способом перехода от денатурирующих условий к ренатурирующим является быстрое разбавление концентрированного белкового денатуранта в буфере рефолдинга [11]. За последние годы была накоплена большая информационная база добавок, которые способствуют принятию правильной конформации полипептидной цепи в растворе [11, 12]. Вспомогательные вещества можно классифицировать на следующие группы: денатуранты, стабилизаторы, ингибиторы агрегации, модуляторы pH и окислительно- восстано-

вительные агенты. Последние два фактора играют особую роль в формировании пространственной структуры белка, так как обеспечивают условия для протекания окислительно-восстановительных реакций [13], что важно при установлении корректных внутримолекулярных взаимодействий [14]. Но поскольку каждый белок имеет уникальную аминокислотную последовательность, подбор буферного состава осуществляется эмпирически и является уникальным для каждого продукта.

Для решения этой задачи в статье рассмотрено применение статистического подхода дизайнера эксперимента (DoE, Design of Experiment) [15]. В контексте подбора условий рефолдинга DoE представляет систематический подход к тестированию различных факторов, таких как pH, концентрации вспомогательных веществ и другие параметры, которые могут влиять на эффективность процесса рефолдинга белков. Данный метод предполагает несколько этапов: (i) скрининг – выявления наиболее значимых факторов для изучаемого процесса; (ii) оптимизация – подбор оптимальных параметров на основании статистической модели с проведением наименьшего числа экспериментов; (iii) валидация полученных результатов – сравнение предсказанных моделью результатов в заданных условиях с фактическими. Этап скрининга может быть пропущен, если набор факторов, влияющих на процесс, известен заранее.

Об эффективности процесса ренатурации могут свидетельствовать показатели хроматографической чистоты целевого белка. Агрегаты целевого белка – одна из основных примесей биотехнологического продукта, которые важно контролировать на конечных этапах производства. Предыдущие исследования показывают, что некорректно свернутые молекулы более склонны к агрегации, чем белки в нативной конформации [16]. Подходы математического моделирования описывают процесс повторного сворачивания как сочетание двух кинетически конкурирующих реакций: образование нерастворимых агрегатов и правильной формы белка [11, 17]. В продукте высокомолекулярные примеси могут быть идентифицированы с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Метод эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC, Size exclusion high-performance liquid chromatography) позволяет разделять молекулы в соответствии с их гидродинамическим радиусом. Отделение агрегатов выполняется в условиях неденатурирующего элюирования, поэтому метод предоставляет воспроизводимую и быструю информацию о наличии высокомолекулярных примесей [18]. Различия в молекулярной массе между агрегатами и нормально сложенными молекулами позволяют использовать SEC-HPLC для оценки содержания высокомолекулярных примесей в конечном продукте.

Таким образом, целью работы являлась оценка влияния факторов концентраций окислителя, восстановителя и pH буфера ренатурации на эффективность процесса рефолдинга Fc-слитого белка *in vitro* и выявление оптимальных условий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объект исследования

Объектом данной работы являлся Fc-слитый белок, полученный в бактериальной системе экспрессии *Escherichia coli* BL21, синтезируемый в виде нерастворимых телец включения (ТВ). Содержание белка в ТВ – 167,86 мг/г. В прокариотической системе экспрессии целевой белок синтезируется в форме мономера. Молекулярная масса димера – 64,4 кДа, изоэлектрическая точка – 5,81.

### Солюбилизация телец включения

Замороженные тельца включения в размере 5 г размораживали при комнатной температуре (22 ± 2) °C в течение часа. Для растворения 5 г телец использовали 25 мл буфера солюбилизации следующего состава: 100 мМ трис (pure EP, USP, neoFroxx GmbH, Германия), 7 М гуанидина гидрохлорида (ч.д.а., ООО «Диаэм», Россия), 1,5 мМ DL-дитиотреитола (х.ч., Helicon, Россия), pH 9,5. Солюбилизат использовали сразу после приготовления.

### Оптимизация условий ренатурации

Планирование эксперимента осуществлялось при помощи программного обеспечения MODDE (v. 12.1, Sartorius Stedim Data Analytics AB, Германия). В работе использована методология поверхности отклика (Response Surface Methodology), которая применяется для оптимизации параметров процесса, если функция, описывающая его, неизвестна. Подход позволяет оценить влияние факторов и их взаимодействия на зависимую переменную. План экспериментов был составлен согласно ортогональному композиционному дизайну (Orthogonal Central Composite design, CCO). В качестве входных факторов были рассмотрены концентрации окислителя [цистамина дигидрохлорид, чистота 98 % (Macklin, Китай)], восстановителя [L-цистеин для клеточной биологии (BioFroxx GmbH, Германия)] и pH буфера для ренатурации, диапазоны их значений представлены в таблице 1. Для центральной точки эксперимент проводился в трехкратной повторности для оценки воспроизводимости процесса. Концентрации других компонентов буфера оставляли фиксированными: 1,5 М мочевины (pure EP, USP, neoFroxx GmbH, Германия), 0,3 М L(+)-аргинина (PhE, USP, АО «ВЕК-ТОН», Россия), 5 мМ ЭДТА динатриевой соли (ч.д.а., АО «ЛенРеактив», Россия), 20 мМ трис (pure EP, USP, neoFroxx GmbH, Германия). Для проведения ренату-

рации в 15 мл буфера брали 149 мкл солюбилизата. Ренатурацию проводили при температуре 4 °C в течение 16 ч.

**Таблица 1. Дизайн эксперимента по оптимизации условий ренатурации Fc-слитого белка**

**Table 1. Design of an experiment to optimize the conditions of Fc-fusion protein renaturation**

№	pH	Восстановитель, мМ Reducing agent, mM	Окислитель, мМ Oxidative agent, mM	Выход белка, площадь под пиком Yield, the area under the peak	Хроматографическая чистота, % Chromatographic purity, %
1	7,5	0,75	0,75	342,977	41,7891
2	9	0,75	0,75	430,338	51,2618
3	7,5	1,5	0,75	355,909	43,9371
4	9	1,5	0,75	468,153	54,1092
5	7,5	0,75	1,5	353,767	44,0363
6	9	0,75	1,5	417,976	50,2719
7	7,5	1,5	1,5	347,427	44,8696
8	9	1,5	1,5	436,884	51,7405
9	7,23515	1,125	1,125	331,486	43,1242
10	9,26485	1,125	1,125	444,901	53,8106
11	8,25	0,617576	1,125	379,96	46,8583
12	8,25	1,63242	1,125	388,856	47,9297
13	8,25	1,125	0,617576	393,335	47,742
14	8,25	1,125	1,63242	396,955	48,096
15	8,25	1,125	1,125	404,675	49,0536
16	8,25	1,125	1,125	414,575	48,8749
17	8,25	1,125	1,125	407,375	48,4818

**Примечание.** Выход белка определяли как абсолютное значение площади *S* под пиком, хроматографическую чистоту – как отношение площади целевого пика к общей площади под пиками, выражали в %.

**Note.** Protein yield was determined as the absolute value of the area *S* under the peak, chromatographic purity is the ratio of the area of the target peak to the total area under the peaks as a percentage.

В качестве выходных переменных рассматривали хроматографическую чистоту димерной формы и выход белка по данным высокоэффективной гель-фильтрационной хроматографии.

Для описания процесса и оценку прогностической модели проводили согласно уравнению множественной линейной регрессии для каждого отклика:

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^3 A_i X_i + \sum_{i < j}^3 A_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^3 A_{ii} X_i^2, \quad (1)$$

где  $A_0$ ,  $A_i$ ,  $A_{ij}$  и  $A_{ii}$  – коэффициенты регрессии;  $Y$  – значение зависимой переменной,  $X_i$ ,  $X_j$  – независимые переменные.

Оценку статистической модели проводили по показателям коэффициента детерминации  $R^2$  (характеризует долю дисперсии, которая объясняется моделью) и коэффициента точности прогнозирования  $Q^2$  (оценивает предсказательную способность модели). Модель считается приемлемой при показателях  $R^2 > 0,75$  и  $Q^2 > 0,5$ . Также разница между  $Q^2$  и  $R^2$  не должна превышать 0,3.

### Валидация модели и результатов оптимизации

Для валидации модели был проведен рефолдинг в трехкратной повторности в условиях, подобранных в результате оптимизации. Для полученных результатов рассчитывали среднее арифметическое и доверительный интервал. После чего сравнивали значения откликов, предсказанные моделью, с экспериментальными данными.

Для валидации результатов был проведен рефолдинг в буфере стандартного состава и в условиях, подобранных в результате оптимизации с подходом DoE. Тельца включения, параметры солиubilизации и неварьируемые условия ренатурации были идентичными, как для этапа оптимизации. Условия рефолдинга для стандартных и оптимизированных условий представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Параметры рефолдинга Fc-слитого белка в стандартных и оптимизированных условиях**

**Table 2. Parameters of Fc-fusion protein refolding under standard and optimized conditions**

Параметр Parameter	Стандартные условия Standard conditions	Оптимизированные условия Optimized conditions
pH буферной среды pH of the buffer solution	8,0	9,15
Окислитель, mM Reducing agent, mM	1,5	0,88
Восстановитель, mM Oxidative agent, mM	1,5	1,36

После окончания рефолдинга пробы образцов были проанализированы методом SEC-HPLC.

### Оценка хроматографической чистоты и выхода продукта методом SEC-HPLC

В данной работе использовался жидкостный хроматограф Prominence-i LC-2030C (серийный номер L21445301965 AE, Shimadzu Corporation, Япония) и хроматографическая колонка TSKgel G2000SW, 300 × 7,5 мм, 10 мкм (Tosoh Bioscience). В качестве подвиж-

ной фазы применяли 10 mM фосфатно-солевой буфер с 490 mM натрия хлорида при pH = 7,40 ± 0,05. Установленное значение скорости потока – 1,0 мл/мин, температура колонки составляла 30 °C, а длина волны детектирования – 230 нм.

В качестве холостой пробы использовали воду для хроматографии. Для проверки разделительной способности в хроматографическую вialу помещали 2 мг стандартного образца (стандартный образец предприятия, лиофилизат целевого белка с подтвержденной подлинностью, чистотой и количественным определением) и выдерживали 15 мин при 105 °C. Затем добавляли 1 мл воды для хроматографии и перемешивали

Чувствительность методики оценивали на растворе целевого белка с концентрацией около 0,001 мг/мл. Испытуемый образец разводили в 10 раз.

Интегрирование проводили с 7-й по 14-ю минуту. На хроматограмме испытуемого образца не учитывались пики, присутствующие на хроматограмме холостой пробы, а также пики с площадью, меньшей площади пика целевого белка на хроматограмме раствора для проверки чувствительности.

Содержание высокомолекулярных примесей определяли как отношение площади высокомолекулярных примесей к площади пика целевого белка, выраженное в процентах.

### Статистическая обработка

Для проверки статистических моделей и оценки значимости изучаемых факторов в рамках DoE применяли дисперсионный анализ (ANOVA). Данные представляли в виде среднего значения и стандартного отклонения при уровне значимости 95 %. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения MODDE.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Оптимизация условий ренатурации Fc-слитого белка с использованием статистического подхода DoE

После проведения серии экспериментов согласно составленному ранее дизайну полученные данные были проанализированы с помощью методологии поверхности отклика.

Для параметра «хроматографическая чистота» значения критериев  $R^2$  и  $Q^2$  составили 0,993 и 0,973, для выхода белка – 0,954 и 0,988. Различие между значениями  $R^2$  и  $Q^2$  было менее 0,3 для каждой модели. Эти результаты свидетельствуют о том, что полученные модели хорошо описывают экспериментальные данные и обладают прогностической способностью, что подтверждает их пригодность для дальнейшей работы.

Для описания изучаемых переменных были получены следующие квадратичные уравнения регрессии:

$$Y_1 = -118,62 + 55,84X_1 - 128,40X_2 + 198,29X_3 + 22,28X_1X_2 - 20,42X_1X_3 - 33,94X_2X_3, \quad (2)$$

$$Y_2 = -36,88 + 8,67X_1 + 14,70X_2 + 32,16X_3 - 4,45X_2^2 - 2,41X_3^2 - 2,91X_1X_3 - 2,39X_2X_3, \quad (3)$$

где  $Y_1$  и  $Y_2$  – выход белка и хроматографическая чистота соответственно;  $X_1$  – pH буферной среды;  $X_2$  – концентрация восстановителя;  $X_3$  – концентрация окислителя.

Эффект изучаемых параметров процесса признавался статистически значимым при  $p < 0,05$ . Коэффициенты исключались из уравнений, если  $p$ -значение для них превышало 0,05 и их удаление не снижало предсказательную способность модели. Уравнения использовали для поиска оптимальных значений переменных с помощью программного обеспечения MODDE, при которых изучаемые отклики максимальны. На основании полученных квадратичных моделей были построены графики поверхностей откликов для каждой из зависимых переменных (рисунок 1).

Было показано, что на оба отклика среди всех рассматриваемых параметров наибольшее влияние оказывает pH буферной среды (рисунок 2). Между этим фактором и зависимыми переменными наблюдалась положительная обратная связь: чем выше pH буферной среды, тем больше выход целевого белка и выше процент хроматографической чистоты. Полученный результат соотносится с предыдущими исследованиями: с отдалением pH среды от изоэлектрической точки белка повышается его растворимость [11], что увеличивает долю целевого белка в образце и способствует правильной повторной укладке молекулы. Кроме того, в таких условиях белок имеет суммарный отрицательный заряд и неспецифические электростатические взаимодействия снижают его склонность к агрегации [19], что также положительно сказывается на реакциях повторного сворачивания. Однако следует учитывать, что экстремальные значения pH (>10) могут привести к потенциальным изменениям структуры, функции, стабильности и иммуногенности белка [20].

Обнаруживается также значимое линейное положительное и квадратичное отрицательное влияние концентрации восстановителя на показатель хроматографической чистоты целевого белка. Вероятно, в небольшой концентрации восстановитель снижает количество нецелевых S—S-связей, однако избыток цистеина смещает равновесие окислительно-восстановительной реакции в сторону восстановления, что приводит к разрыву всех дисульфидных взаимодействий и нарушению вторичной структуры белка [21].

Внутридоменные дисульфидные связи Fc-фрагмента важны для стабилизации молекулы в физиологических условиях [22]. Известно, что образование этих связей является критическим фактором для корректной пространственной структуры при повторном

сворачивании белка [23]. Присутствие восстановителя в небольших количествах позволяет снизить число нецелевых внутри- и межмолекулярных взаимодействий путем поддержания остатков цистеина в восстановленном состоянии [16, 24]. Тенденция линейного влияния фактора наблюдается также и для второго отклика ( $p = 0,0642$ )

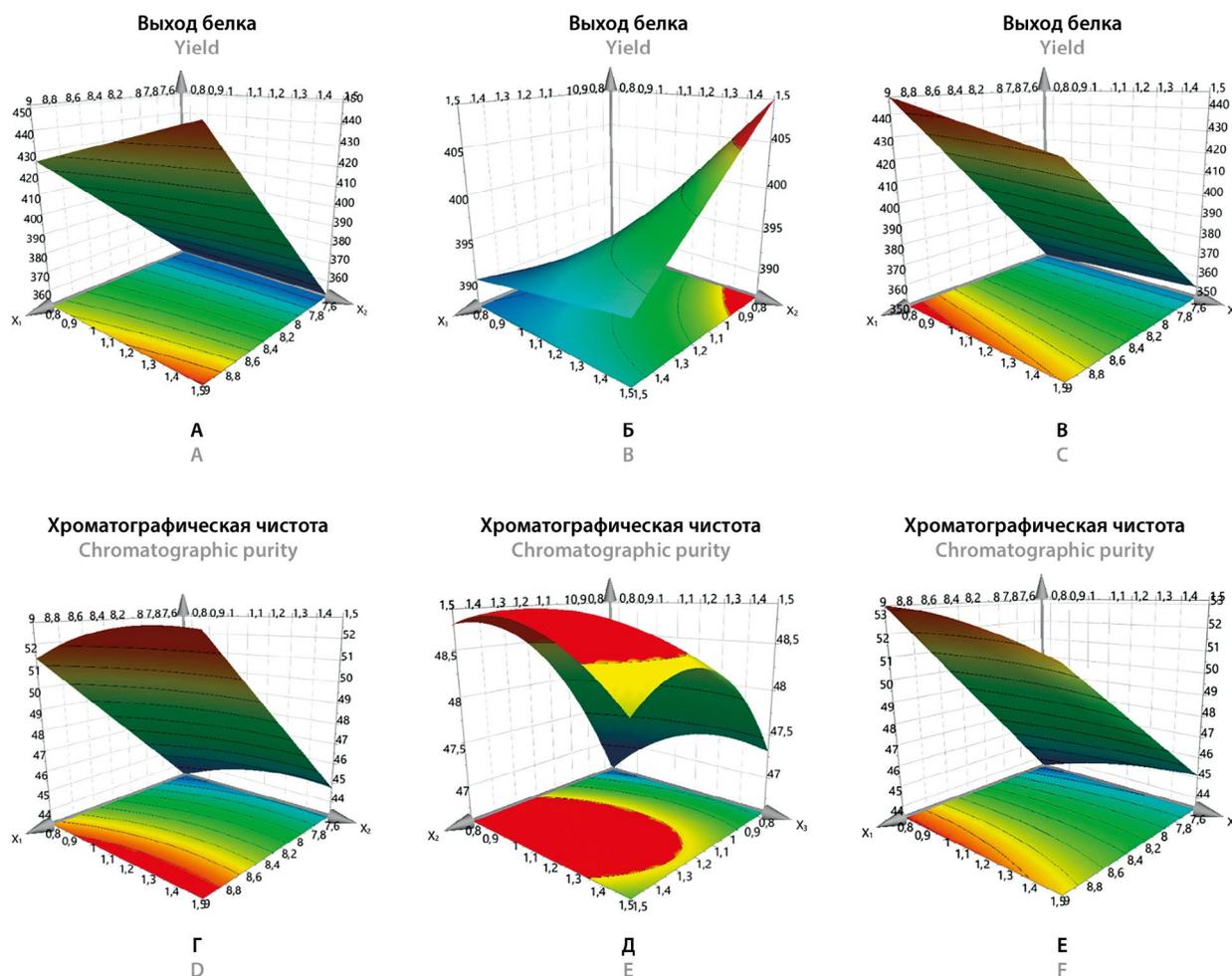
Для фактора «концентрация окислителя» не было обнаружено значимого влияния на изучаемые отклики, однако исключить данный параметр из математических уравнений невозможно: для выхода целевого белка в этом случае наблюдается значительное снижение показателей качества модели ( $R^2$  и  $Q^2$ ), а в уравнении хроматографической чистоты присутствуют значимые коэффициенты взаимодействий с другими факторами (уравнение 2).

Было выявлено значимое взаимное влияние факторов «pH буферной среды» и «концентрация окислителя», а также концентрации окислителя и восстановителя на показатель хроматографической чистоты целевого продукта (рисунок 2). Известно, что окислительно-восстановительный потенциал системы определяется именно этими факторами (согласно уравнению Нернста) [25]. В тиол-дисульфидных реакциях окисления и восстановления участвуют ионы водорода, поэтому pH среды также оказывает существенное влияние. Смещение равновесного потенциала реакции за счет таких сложных взаимодействий изменяет условия формирования дисульфидных связей в белке.

По результатам оптимизации максимальные значения откликов достигаются при следующих параметрах: pH среды – 9,15, концентрация окислителя и восстановителя – 0,88 и 1,36 mM соответственно. Полученное расчетное значение концентрации восстановителя превышает концентрацию окислителя, что объясняется уравнением окислительно-восстановительной реакции: в восстановлении задействованы две молекулы тиола, в то время как для окисления необходима одна молекула дисульфида (рисунок 3). Добавление восстановителя способствует поддержанию остатков цистеина в восстановленном состоянии и таким образом предотвращает образование нецелевых дисульфидных связей в белковых растворах при щелочном pH [16].

### Валидация модели и условий рефолдинга

Валидацию модели считали успешной, если при трехкратном воспроизведении эксперимента с оптимальными параметрами предсказанное значение находилось в пределах доверительного интервала, рассчитанного на основании полученных экспериментальных данных. На рисунке 4 представлено сравнение предсказанного значения для исследуемых показателей со значением, полученным экспериментально при проведении рефолдинга белка в оптимальных условиях.

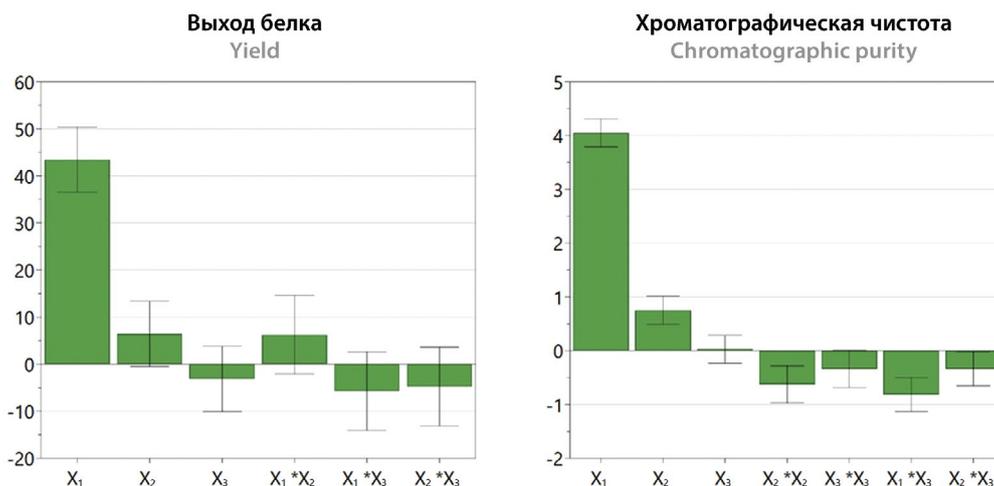


**Рисунок 1.** Трехмерные графики поверхностей откликов:

$X_1$  – pH среды;  $X_2$  – концентрация восстановителя;  $X_3$  – концентрация окислителя. А – трехмерный график поверхности отклика для выхода белка, показывающий взаимодействие эффектов pH среды и концентрации восстановителя при постоянном значении концентрации окислителя 1,125 мМ; Б – трехмерный график поверхности отклика для выхода белка, показывающий взаимодействие эффектов концентрации окислителя и концентрации восстановителя при постоянном значении pH 8,25; В – трехмерный график поверхности отклика для выхода белка, показывающий взаимодействие эффектов pH среды и концентрации окислителя при постоянном значении концентрации восстановителя 1,125 мМ; Г – трехмерный график поверхности отклика для хроматографической чистоты, показывающий взаимодействие эффектов pH среды и концентрации восстановителя при постоянном значении концентрации окислителя 1,125 мМ; Д – трехмерный график поверхности отклика для хроматографической чистоты, показывающий взаимодействие эффектов концентрации окислителя и концентрации восстановителя при постоянном значении pH 8,25; Е – трехмерный график поверхности отклика для хроматографической чистоты, показывающий взаимодействие эффектов pH среды и концентрации окислителя при постоянном значении концентрации восстановителя 1,125 мМ

**Figure 1.** Three-dimensional response surface plots:

$X_1$  – pH of the buffer;  $X_2$  – concentration of the reducing agent;  $X_3$  – concentration of the oxidative agent. А – three-dimensional response surface plot for protein yield, showing the interaction of the effects of the pH of the buffer and the concentration of the reducing agent at a constant value of the oxidative agent concentration of 1.125 mM; Б – three-dimensional response surface plot for protein yield, showing the interaction of the effects of the concentration of the oxidative agent and the concentration of the reducing agent at a constant the pH value of 8.25; В – three-dimensional response surface plot for protein yield, showing the interaction of the effects of the pH of the buffer and the concentration of the oxidative agent at a constant value of the reducing agent concentration of 1.125 mM; Д – three-dimensional response surface plot for chromatographic purity, showing the interaction of the effects of the pH of the buffer and the concentration of the reducing agent at a constant value of the oxidative agent concentration of 1.125 mM; Е – three-dimensional response surface plot for chromatographic purity, showing the interaction of the effects of the concentration of the oxidative agent and the concentration of the reducing agent at a constant pH value of 8.25; F – three-dimensional response surface plot for chromatographic purity, showing the interaction of the effects of the pH of the buffer and the concentration of the oxidative agent at a constant value of the reducing agent concentration of 1.125 mM

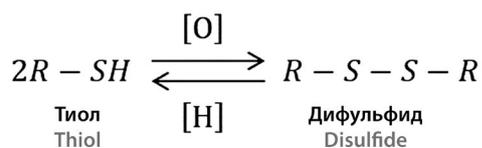


**Рисунок 2.** Коэффициенты регрессии для откликов «выход белка» (слева) и «хроматографическая чистота» (справа):

$X_1$  – pH среды;  $X_2$  – концентрация восстановителя;  $X_3$  – концентрация окислителя

**Figure 2.** Regression coefficients for protein yield response (left) and chromatographic purity response (right):

$X_1$  – pH of the buffer;  $X_2$  – concentration of the reducing agent;  $X_3$  – concentration of the oxidative agent

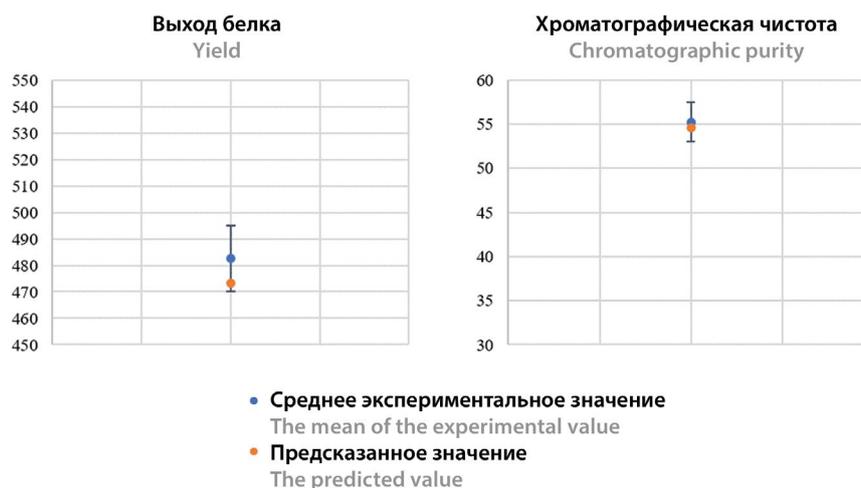


**Рисунок 3.** Уравнение окислительно-восстановительной реакции

**Figure 3.** The equation of the redox reaction

Полученные данные демонстрируют, что предсказанные моделью значения находятся в границах доверительного интервала экспериментальных данных, что подтверждает валидность модели и позволяет использовать ее в дальнейшей работе.

Для валидации результатов оптимизации был проведен рефолдинг Fc-слиятого белка в буфере стандартного состава и в условиях, подобранных в результате оптимизации с подходом DoE. Образцы были проанализированы методом SEC-HPLC (рисунок 5, таблица 3).



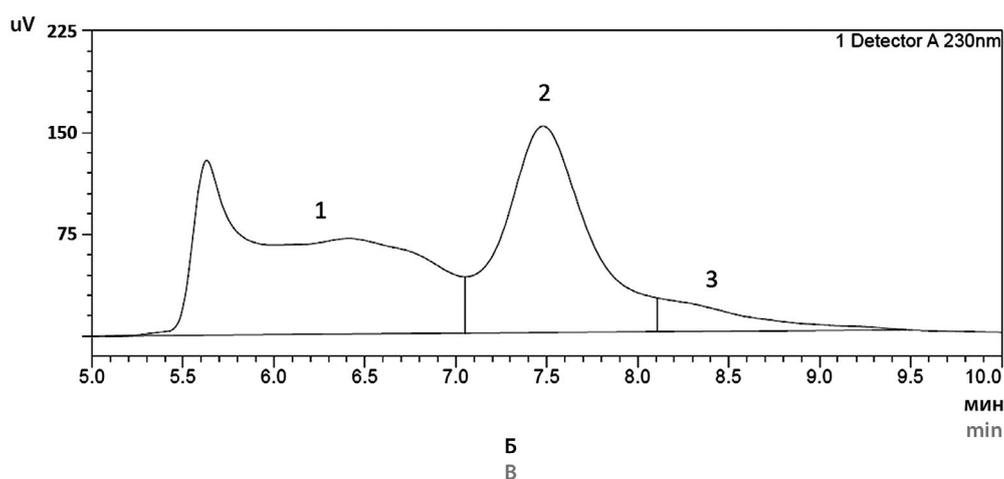
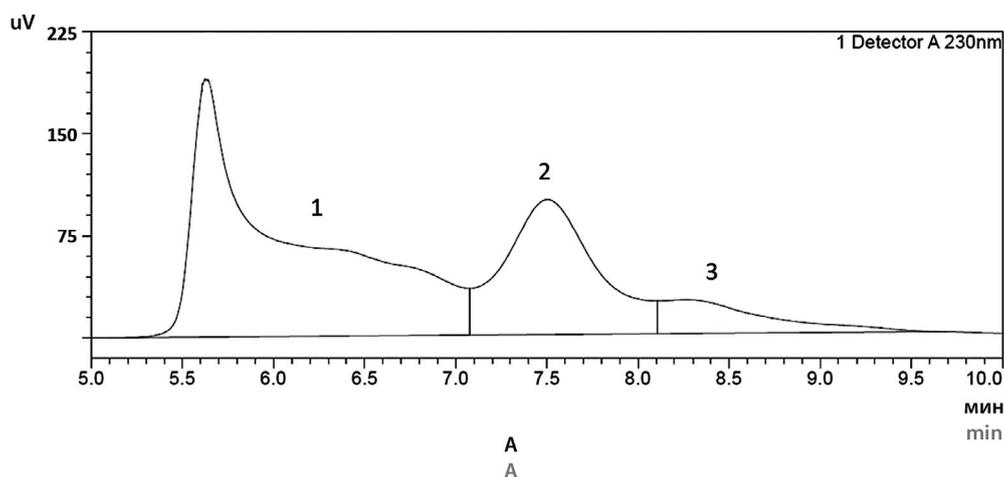
**Рисунок 4.** Валидация результатов DoE (среднее экспериментальное значение – среднее арифметическое, полученное на основании трехкратно проведенного эксперимента в оптимальных условиях; предсказанное значение – теоретическое значение исследуемых параметров, предсказанное моделью)

**Figure 4.** Validation of DoE results (the average experimental value is the mean obtained on the basis of a three-time experiment conducted under optimal conditions; the predicted value is the theoretical value of the studied parameters predicted by the model)

**Таблица 3.** Сравнение показателей хроматографической чистоты и выхода белка для стандартных и оптимизированных условий рефолдинга

**Table 3.** Comparison of chromatographic purity and protein yield for standard and optimized refolding conditions

Соединение Compound	Выход белка Yield		Процент площади пика от общей площади интегрирования Percentage of the peak area of the total integration area	
	Стандартные условия Standart conditions	Оптимизированные условия Optimized conditions	Стандартные условия Standart conditions	Оптимизированные условия Optimized conditions
Высокомолекулярные примеси High molecular weight compounds	727,58	633,99	69,57	60,62
Димер Fc-слитого белка Fc-fused protein dimer	360,80	482,61	34,50	46,14
Несложные молекулы Unfolded molecules	102,90	74,70	9,84	7,14



**Рисунок 5.** Хроматограммы SEC-HPLC для стандартных (А) и оптимизированных условий рефолдинга (Б).

1 – пик высокомолекулярных соединений; 2 – пик димера Fc-слитого белка; 3 – пик несложных молекул

**Figure 5.** SEC-HPLC chromatograms for standard (A) and optimized refolding conditions (B).

1 – peak of high molecular weight compounds; 2 – peak of Fc-fused protein dimer; 3 – peak of unfolded molecules

На полученных хроматограммах наблюдается сокращение площади под пиками высокомолекулярных соединений и несложных молекул в оптимальных условиях относительно стандартных. При этом хроматографическую чистоту димера удалось увеличить более чем на 10 %.

Таким образом, в ходе проведенных исследований удалось оптимизировать условия рефолдинга Fc-слитого белка. Полученные результаты валидации подтверждают значимое влияние на эффективность процесса факторов pH буферной среды, концентрации окислителя и восстановителя.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была показана эффективность статистического подхода DoE для решения задач, требующих большого количества однотипных экспериментов, на примере подбора условий ренатурации Fc-слитого белка. Построенные статистические модели демонстрируют высокую прогностическую способность и хорошо описывают экспериментальные данные (разница между  $R^2$  и  $Q^2$  не превышает 0,3 для каждой из моделей), что позволяет использовать их в дальнейшей работе.

Оптимизация условий ренатурации позволила сократить число высокомолекулярных примесей и несложных форм белка в целевом продукте. Отмечено значимое влияние pH буферного раствора, соотношения концентраций окислительно-восстановительной пары и взаимного влияния факторов на выход и хроматографическую чистоту Fc-слитого белка. Предполагается, что оптимальное соотношение компонентов окислительно-восстановительной пары должно обеспечивать потенциал среды, необходимый для формирования правильных дисульфидных связей, при этом концентрация восстановителя должна превышать концентрацию окислителя. Эффекты, оказываемые окислительным и восстановительным компонентами, находятся в тесной взаимосвязи с pH раствора. Повышенный pH буферной среды способствует улучшению растворимости белка, что обеспечивает лучшие условия для реакций повторного сворачивания полипептидной цепи.

Результаты работы могут быть использованы при разработке технологий выделения и очистки аналогичных белковых молекул. Установленные взаимосвязи позволяют проводить подбор условий рефолдинга для схожих молекулярных конструкций более эффективно.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Jafari R., Zolbanin N.M., Rafatpanah H., Majidi J., Kazemi T. Fc-fusion Proteins in Therapy: An Updated View. *Current Medicinal Chemistry*. 2017;24(12):1228–1237. DOI: 10.2174/0929867324666170113112759.
2. Rath T., Baker K., Dumont J.A., Peters R.T., Jiang H., Qiao S.-W., Lencer W.I., Pierce G.F., Blumberg R.S. Fc-fusion proteins and FcRn: structural insights for longer-lasting and more effective therapeutics. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2015;35(2):235–254. DOI: 10.3109/07388551.2013.834293.
3. Liu L. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins. *Protein & Cell*. 2018;9(1):15–32. DOI: 10.1007/s13238-017-0408-4.
4. Carrió M.M., Cubarsi R., Villaverde A. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*. 2000;471(1):7–11. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01357-0.
5. Bhatwa A., Wang W., Hassan Y.I., Abraham N., Li X.-Z., Zhou T. Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9:630551. DOI: 10.3389/fbioe.2021.630551.
6. Maas C., Hermeling S., Bouma B., Jiskoot W., Gebbink M.F.B.G. A Role for Protein Misfolding in Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(4):2229–2236. DOI: 10.1074/jbc.M605984200.
7. Micheletti C. Comparing proteins by their internal dynamics: Exploring structure–function relationships beyond static structural alignments. *Physics of Life Reviews*. 2013;10(1):1–26. DOI: 10.1016/j.plrev.2012.10.009.
8. Bahar I., Lezon T.R., Yang L.-W., Eyal E. Global Dynamics of Proteins: Bridging Between Structure and Function. *Annual Review of Biophysics*. 2010;39:23–42. DOI: 10.1146/annurev.biophys.093008.131258.
9. Seckler R., Jaenicke R. Protein folding and protein refolding. *The FASEB Journal*. 1992;6(8):2545–2552. DOI: 10.1096/fasebj.6.8.1592207;
10. Depuydt M., Messens J., Collet J.-F. How Proteins Form Disulfide Bonds. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;15(1):49–66. DOI: 10.1089/ars.2010.3575.
11. Buscajoni L., Martinetz M.C., Berkemeyer M., Brocard C. Refolding in the modern biopharmaceutical industry. *Biotechnology Advances*. 2022;61:108050. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2022.108050.
12. Roufarshbaf M., Akbari V. Development of Solubilization and Refolding Buffers. In: Kopp J., Spadiut O., editors. *Inclusion Bodies*. Totowa: Humana Press; 2023. P. 155–164. DOI: 10.1007/978-1-0716-2930-7\_10.
13. Feige M.J., Hendershot L.M. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011;23(2):167–175. DOI: 10.1016/j.ceb.2010.10.012.
14. Narayan M. Revisiting the Formation of a Native Disulfide Bond: Consequences for Protein Regeneration and Beyond. *Molecules*. 2020;25(22):5337. DOI: 10.3390/molecules25225337.
15. Mandenius C.-F., Brundin A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. *Biotechnology Progress*. 2008;24(6):1191–1203. DOI: 10.1002/btpr.67.
16. De Bernardes Clark E. Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001;12(2):202–207. DOI: 10.1016/S0958-1669(00)00200-7.
17. Maiti M., Rao M., Sastry S. Competition between folding and aggregation in a model for protein solutions.

- The European Physical Journal E*. 2010;32(2):217–221. DOI: 10.1140/epje/i2010-10621-4.
18. Brusotti G., Calleri E., Colombo R., Massolini G., Rinaldi F., Temporini C. Advances on Size Exclusion Chromatography and Applications on the Analysis of Protein Biopharmaceuticals and Protein Aggregates: A Mini Review. *Chromatographia*. 2018;81(1):3–23. DOI: 10.1007/s10337-017-3380-5.
  19. Alam P., Siddiqi K., Kumar Chturvedi S., Khan R.H. Protein aggregation: From background to inhibition strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;103:208–219. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.048.
  20. Gervais D. Protein deamidation in biopharmaceutical manufacture: understanding, control and impact. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2016;91(3):569–575. DOI: 10.1002/jctb.4850.
  21. Góngora-Benítez M., Tulla-Puche J., Albericio F. Multifaceted Roles of Disulfide Bonds. Peptides as Therapeutics. *Chemical Reviews*. 2014;114(2):901–926. DOI: 10.1021/cr400031z.
  22. Wang T., Fodor S., Hapuarachchi S., Grace Jiang X., Chen K., Apostol I., Huang G. Analysis and characterization of aggregation of a therapeutic Fc-fusion protein. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013;72:59–64. DOI: 10.1016/j.jpba.2012.09.010.
  23. Wiedemann C., Kumar A., Lang A., Ohlenschläger O. Cysteines and Disulfide Bonds as Structure-Forming Units: Insights From Different Domains of Life and the Potential for Characterization by NMR. *Frontiers in Chemistry*. 2020;8:280. DOI: 10.3389/fchem.2020.00280.
  24. Yamaguchi H., Miyazaki M. Refolding Techniques for Recovering Biologically Active Recombinant Proteins from Inclusion Bodies. *Biomolecules*. 2014;4(1):235–251. DOI: 10.3390/biom4010235.
  25. Walczak M.M., Dryer D.A., Jacobson D.D., Foss M.G., Flynn N.T. pH Dependent Redox Couple: An Illustration of the Nernst Equation. *Journal of Chemical Education*. 1997;74(10):1195.