



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2024.06.26

(21) Номер заявки

202391135

(22) Дата подачи заявки

2021.10.15

(51) Int. Cl. **G01N 31/16** (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ТИТРОВАНИЯ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОЛИВИНИЛСУЛЬФОНАТА (PVS) В БУФЕРАХ

(31) 63/093,124; 63/144,744; 63/251,465

(32) 2020.10.16; 2021.02.02; 2021.10.01

(33) US

(43) 2023.06.13

(86) PCT/US2021/055116

(87) WO 2022/081938 2022.04.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Сото Роберт Джозеф (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) KARL-HEINZ WASSMER ET AL.: "Characterization and detection of polyanions by direct polyelectrolyte titration", *MACROMOLECULAR CHEMISTRY AND PHYSICS*, WILEY-VCH, WEINHEIM, DE, vol. 192, no. 3, 1 March 1991 (1991-03-01), pages 553-565, XP055881506, ISSN: 0025-116X, DOI: 10.1002/macp.1991.021920308, abstract; figures 2-5, 7 page 554, paragraph Reagents - page 555, page 564, paragraph 2

KEIHEI UENO ET AL.: "Colloid Titration - A Rapid Method for the Determination of Charged Colloid", *JOURNAL OF CHEMICAL EDUCATION*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 62,

no. 7, 1 July 1985 (1985-07-01), pages 627-629, XP001038611, ISSN: 0021-9584, page 627, left-hand column; figure 1, page 627, paragraph, page 628, page 629, paragraph General Procedure

NEDIME DÜRÜST ET AL.: "Potentiometric determination of some food additives and their binding to a polycationic species using polyion sensors", *TURKISH JOURNAL OF CHEMISTRY*, vol. 37, 17 April 2013 (2013-04-17), pages 308-315, XP055209201, DOI: 10.3906/kim-1208-10, abstract; figures 1-4, 6, page 309, page 310, paragraph 2.3, page 311, paragraph 3.1, page 314, paragraph 4

DAI S. ET AL.: "Bioanalytical applications of polyion-sensitive electrodes", *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 19, 1 January 1999 (1999-01-01), pages 1-14, XP001016409, ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/S0731-7085(98)00134-4, abstract; figures 2-4, page 6, paragraph 3.1. page 7, right-hand column, page 8, paragraph 3.2

DE-A1-2728951

TAYLOR ZHANG ET AL.: "SEC Assay for Polyvinylsulfonic Impurities in 2-(N-Morpholino)ethanesulfonic Acid. Using a Charged. Aerosol Detector", *CHROMATOGRAPHIA*, VIEWEG + TEUBNER VERLAG, SPRINGER, WIESBADEN, DE, vol. 72, no. 1-2, 29 May 2010 (2010-05-29), pages 145-149, XP019810241, ISSN: 1612-1112, DOI: 10.1365/sl0337-010-1626-6, abstract; table 3, page 145, paragraph Introduction

(57) Изобретение предусматривает способы, в том числе автоматизированные способы, определения уровней полианионов, таких как поливинилсульфонаты, в жидкостях, таких как буферы, с помощью комплексонометрических методик или методик на основе титрования. Было показано, что такие полианионные соединения ингибируют ферменты, вовлеченные в ПЦР, что затрудняет попытки контроля чистоты белков, полученных из клеточной культуры, например биопрепаратов и биоаналогов.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на данное изобретение испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/093124, поданной 16 октября 2020 г., предварительной заявки на патент США № 63/144744, поданной 2 февраля 2021 г., и предварительной заявки на патент США № 63/251465, поданной 1 октября 2021 г., которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Область изобретения

Настоящее изобретение в целом относится к области химии и, более конкретно, к области определения, или титрования, концентрации соединений в жидкостях.

Уровень техники

Биопрепараты и биоаналоги стали важными терапевтическими классами для лечения заболеваний и состояний человека и других животных. Такие продукты, которые включают рекомбинантные белки, такие как антитела различных форм и их фрагменты, которые сохраняют связывающую способность, обычно получают из клеточной культуры. В результате такие терапевтические средства должны быть очищены от загрязняющих веществ, наличие которых свойственно процессам культивирования клеток, таких как ненужные и потенциально токсичные белки, липиды, углеводы и другие малые молекулы, ассоциированные с растущими в культуре клетками. По мере постепенного очищения терапевтических биопрепаратов и биоаналогов путем отделения от этих загрязняющих веществ культуры, терапевтические средства стабилизируются в забуференном растворе. Более того, в ходе очищения необходимо контролировать уровень чистоты, чтобы обеспечить безопасность использования терапевтического средства. Одним из примечательных загрязняющих веществ, обнаруживаемых при очищении терапевтических средств из клеточных культур, являются фрагменты ДНК клетки-хозяина. Остаточные количества ДНК клетки-хозяина могут выдержать сложные процессы очищения, оставаясь вредным загрязняющим веществом очищенного терапевтического средства. Остаточная ДНК клетки-хозяина, содержащаяся в составе белка, таком как биопрепарат или биоаналог, для введения животному, например пациенту-человеку, может вызвать нежелательный иммунный ответ или повысить риск развития рака. В результате этого правительства ввели ограничения на концентрацию ДНК клетки-хозяина, содержащейся в составе для введения человеку. Всемирная организация здравоохранения (WHO) и Европейский союз (EU), например, допускают количества до 10 нг/доза остаточной ДНК клетки-хозяина, в то время как Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США разрешает не более 100 пг/доза.

Учитывая низкие уровни ДНК клетки-хозяина, допустимые в терапевтических составах, предназначенных для введения людям, необходимы чувствительные и точные способы определения уровней ДНК клетки-хозяина в таких составах. Один из подходов к количественному определению низких уровней нуклеиновых кислот в образцах заключается в применении полимеразной цепной реакции, например, путем контроля уровней нуклеиновой кислоты в реальном времени с помощью qPCR. ПЦР представляет собой методику, основанную на ферментах, в которой используют ферментативные полимеразы для амплификации низких уровней нуклеиновых кислот для облегчения их обнаружения.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предусматривает способы определения или титрования уровня полианиона в образце, например в образце, содержащем буферный раствор Гуда, такой как MES. Образец содержит буферный раствор Гуда (например, исходный материал или производственную партию буферного раствора Гуда) и может дополнительно содержать терапевтическое соединение, такое как биологическое средство или малая молекула. Примером полианиона является поливинилсульфонат (т.е. PVS), который часто присутствует в различных количествах в буферных растворах Гуда или в образцах биологических средств на различных стадиях сбора и очищения. Было обнаружено, что такие полианионы, и в частности PVS, ингибируют различные ферменты, в том числе РНК- и/или ДНК-ферменты, такие как полимеразы. В данном документе раскрыты способы определения уровня PVS в образцах. Образцы могут содержать белки, такие как биопрепараты, или могут содержать другие терапевтические соединения, например, терапевтические средства из малых молекул, или и то, и другое, на различных стадиях производства, сбора или очищения. С помощью способов, известных из уровня техники, не поддаются обнаружению низкие уровни PVS в таких образцах, что приводит к загрязнению PVS терапевтических соединений, таких как биопрепараты. Такое загрязнение может препятствовать разрешению на применение у людей, а ингибирующее действие PVS затрудняет усилия по контролю других примесей в препаратах на основе продуктов, таких как нуклеиновые кислоты хозяина. Полианионы, такие как PVS, ингибируют ферменты, используемые в стандартных анализах нуклеиновых кислот, таких как ПЦР, например qPCR, что приводит к неточным измерениям загрязняющих нуклеиновых кислот хозяина.

В данном документе раскрыт чувствительный, точный и тщательный способ измерения уровней PVS, известного ингибитора РНК-ферментов, в образцах, содержащих буферный раствор Гуда (таких как образцы белка), путем титрования. Способы титрования в соответствии с настоящим изобретением проявляют динамический диапазон обнаружения в 1,5 порядка величин, являются высокоселективными для PVS по отношению к MES, обеспечивают простое считывание с точкой перегиба или эквивалентности,

обеспечивая простой вывод "успех/неудача" для рассматриваемых партий буфера MES для использования при контроле загрязнения нуклеиновой кислотой клетки-хозяина белковых образцов, таких как биологические образцы. Способ также подходит для автоматизированных электрохимических или спектроскопических (например, колориметрических, фотометрических, флуориметрических, рамановских или FTIR-спектроскопических) зондов для определения конечной точки при разумной стоимости, а также для недорогих вариантов осуществления, основанных на схемах стандартного ручного титрования.

Более подробно в настоящем изобретении предусмотрен способ титрования для выявления полианионного ингибитора ферментов в жидкости, включающий (a) приведение в контакт жидкости с известным количеством поликатионного соединения; (b) приведение в контакт материала (a) с индикаторным соединением, где индикаторное соединение проявляет измененное свойство в свободной форме по сравнению с его формой при нахождении в комплексе с поликатионным соединением, и где достаточное количество индикаторного соединения добавляют для определения свободной формы индикаторного соединения при отсутствии комплексообразования; (c) повторение (a) и (d) выявление свободной формы индикаторного соединения в точке титрования, за счет чего выявляют полианионного ингибитора ферментов. Индикаторное соединение может состоять из анионного индикатора или содержать его, в том числе без ограничения полианионного индикаторного соединения. В некоторых вариантах осуществления жидкость содержит буфер, по сути состоит из или состоит из него. Предполагается, что (b) добавление индикаторного соединения к жидкости может быть выполнено до первой итерации (a), одновременно с ней или после нее, хотя следует отметить, что в случае последующего добавления индикаторного соединения, индикаторное соединение будет добавлено до повторения (a). В некоторых вариантах осуществления получают множество образцов буфера, где каждый образец буфера характеризуется разной концентрацией буферного соединения, за счет чего получают серию разбавлений буфера. В некоторых вариантах осуществления предел выявления поливинилсульфоната (PVS) составляет 1,5 части на миллион буферного раствора, 0,25 части на миллион буферного раствора или 0,16 мкг/мл буферного раствора. В некоторых вариантах осуществления предел выявления поливинилсульфоната (PVS) составляет 1,5 части на миллион буферного соединения или 0,25 части на миллион буферного соединения. Например, с помощью автоматизированных способов, как описано в данном документе, можно идентифицировать PVS при пределе выявления 0,25 части на миллион буферного соединения. В некоторых вариантах осуществления конечная точка титрования представляет собой точку, где поглощающая способность образца находится посередине между начальной поглощающей способностью образца и установившейся поглощающей способностью или представляет собой локальный максимум первой производной кривой поглощающей способности образца. В некоторых вариантах осуществления свободное индикаторное соединение выявляют электрохимическим или спектроскопическим путем. В некоторых вариантах осуществления выявление с помощью спектроскопии включает колориметрическое выявление, фотометрическое выявление, флуориметрическое выявление, рамановскую или FTIR-спектроскопию. В некоторых вариантах осуществления полианионный ингибитор ферментов представляет собой поливинилсульфонат (PVS) или его производное. В некоторых вариантах осуществления полианионный ингибитор ферментов представляет собой поливинилсульфонат (PVS). В некоторых вариантах осуществления поликатионное соединение представляет собой pH-независимое поликатионное соединение или pH-зависимое поликатионное соединение. В некоторых вариантах осуществления pH-независимое поликатионное соединение представляет собой полимер на основе четвертичного аммония. В некоторых вариантах осуществления pH-зависимое поликатионное соединение представляет собой полиамин. В некоторых вариантах осуществления полимер на основе четвертичного аммония представляет собой бромид гексадиметрина (HDBr), хлорид поли(диаллил)диметиламмония (pDADMAC) или метилгликольхитозан. В некоторых вариантах осуществления полимер на основе четвертичного аммония представляет собой бромид гексадиметрина (HDBr). В некоторых вариантах осуществления к жидкости добавляют несколько аликвот HDBr, в совокупности составляющих по меньшей мере 0,1% от общего объема жидкости. В некоторых вариантах осуществления полимер на основе четвертичного аммония представляет собой хлорид поли(диаллил)диметиламмония (pDADMAC).

В вариантах осуществления настоящего изобретения может быть использован ряд подходящих индикаторных соединений, таких как анионные индикаторы. В некоторых вариантах осуществления индикаторное соединение представляет собой краситель, такой как азокраситель. В некоторых вариантах осуществления азокраситель представляет собой эриохром черный Т (ЕСВТ), эриохром сине-черный R (Calcon) или натриевую соль сульфазо. В некоторых вариантах осуществления азокраситель представляет собой эриохром черный Т (ЕСВТ). В некоторых вариантах осуществления 0,8-1,7 мкг ЕСВТ добавляют на мл жидкости, содержащей известное количество поликатионного соединения. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой буферный раствор Гуда. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор Гуда содержит производное этансульфоновой кислоты или производное пропансульфоновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор Гуда представляет собой MES, бис-трис-метан, ADA, бис-трис-пропан, PIPES, ACES, MOPSO, хлорид холамина, MOPS, BES, AMPB, HEPES, DIPSO, MOBS, ацетамидоглицин, TAPSO, TEA, POPSO, HEPPSO, EPS, HEPPS, трицин, Трис, глицинамид, глицилглицин, HEPBS, бицин, TAPS, AMPB, CHES, CAPSO, AMP,

CAPS или CABS. Некоторые варианты осуществления способов дополнительно предусматривают определение концентрации полианионного ингибитора ферментов из количества поликатионного соединения, необходимого для титрования полианионного ингибитора ферментов. Некоторые варианты осуществления способов дополнительно предусматривают сравнение результатов с результатами, полученными с помощью стандартной кривой полианионного ингибитора ферментов, за счет чего определяют концентрацию полианионного ингибитора ферментов в жидкости. Например, объем конечной точки может быть рассчитан для набора нескольких полианионных (например, PVS) калибровочных стандартов (например, от 3 до 5 стандартов), и может быть построена стандартная кривая. Стандартная кривая может быть использована для расчета концентрации полианиона в образце на основе значения конечной точки образца. Некоторые варианты осуществления способов дополнительно предусматривают проведение "испытания в предельных условиях", в котором объем конечной точки рассчитывают для холостого образца (не содержащего полианиона, такого как PVS) и образца с концентрацией полианиона (например, PVS) в заданном пределе. Может быть определен объем конечной точки образца, а также проведено аналитическое определение "успех/неудача" на основании того, находится ли или нет концентрация полианиона в образце в пределах указанного предела. В некоторых вариантах осуществления способ является автоматизированным.

Другой аспект настоящего изобретения относится к автоматизированному способу титрования для выявления полианионного ингибитора ферментов в жидкости, включающему (а) объединение жидкости с индикаторным соединением, где индикаторное соединение проявляет измененное свойство в свободной форме по сравнению с его формой при нахождении в комплексе с поликатионным соединением, и где достаточное количество индикаторного соединения добавляют для выявления свободной формы индикаторного соединения при отсутствии комплексообразования; (b) приведение в контакт материала (а) с известным количеством поликатионного соединения; (с) измерение поглощающей способности жидкости, содержащей индикаторное соединение и поликатионное соединение, с применением прибора для титрования; и (d) автоматическое повторение (b) и (с), где выявление свободной формы индикаторного соединения обеспечивает выявление полианионного ингибитора ферментов. Предполагается, что (а) объединение жидкости, содержащей поликатионное соединение и индикаторное соединение, может быть выполнено до первой итерации (b), одновременно с ней или после нее, хотя следует отметить, что в случае последующего объединения индикаторного соединения индикаторное соединение будет добавлено до повторения (b). В некоторых вариантах осуществления жидкость содержит буфер, по сути состоит из или состоит из него. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой буферный раствор Гуда. В некоторых вариантах осуществления способ осуществляют на приборе для титрования. В некоторых вариантах осуществления прибор для титрования содержит насос, такой как шприцевой насос или дозирующий привод с интеллектуальным управлением, в сообщении по текучей среде с поликатионным соединением и жидкостью. Подходящая длина волны поглощения для описанных здесь способов и систем может быть выбрана на основе используемого индикаторного соединения. Например, для индикаторного соединения ЕСВТ подходящей является длина волны 660-665 нм.

Некоторые аспекты включают автоматизированную систему титрования для обнаружения полианионного ингибитора фермента в жидкости. Автоматизированная система титрования может предусматривать систему подачи жидкости, такую как насос. Автоматизированная система титрования может быть выполнена с возможностью автоматического проведения способа, описанного в данном документе. В качестве примера, автоматизированная система титрования может предусматривать прибор для титрования. Например, приборы для титрования, подходящие для способов и систем, описанных в данном документе, коммерчески доступны в линии приборов TITRANDO Metrohm. Необязательно прибор для титрования может содержать насос для жидкостной связи (например, для размещения поликатионного соединения в сообщении по текучей среде с жидкостью), такой как шприцевой насос или насос дозирующего привода с интеллектуальным управлением.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из следующего подробного описания, в том числе графических материалов. Тем не менее, следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на варианты осуществления, приведены только с иллюстративной целью, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области из подробного описания.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. (а) Химическая структура 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (т.е. MES) представлена в кислой форме, в форме гидрата MES и в основной форме, в форме натриевой соли MES. (b) Химические реакции, приводящие к получению соединений, которые могут ингибировать ферменты, обладающие активностью в отношении нуклеиновых кислот, такие как РНК-ферменты. Фиг. 1(b) адаптирована на основе фигуры из публикации Smith, et al., J. Biol. Chem. 278:20934-20938 (2003).

Фиг. 2. (а) Варьирование концентрации поливинилсульфоната (PVS) в диапазоне 0-1,0 ppm позволило построить линейную калибровочную кривую для двух разных партий стандартов PVS, полученных от Sigma-Aldrich, которые поставлялись в форме водных растворов с концентрацией 30 вес.%. Было об-

наружено, что концентрация PVS значительно варьирует в разных партиях. Однако предполагается, что концентрацию конкретной партии можно скорректировать путем ее разведения с тем, чтобы она служила подходящим стандартом. (b) Кривые титрования с применением гексадиметринбромидом (HDBr) для титрования PVS строили в диапазоне концентраций PVS 0-1,0 ppm. Был обнаружен линейный диапазон в приблизительно 1,5 порядка.

Фиг. 3. (a) Схематическое изображение результатов количественной оценки путем титрования PVS посредством HDBr со спектроскопическим выявлением конечной точки. На схеме реакции изображено комплексобразование между PVS и HDBr, обусловленное притягивающими электростатическими взаимодействиями. В конечной точке титрования индикаторное соединение (nD') претерпевает изменение поглощающих свойств при связывании с несущими заряд соседними участками HDBr. Синие круглые символы "плюс" и "минус" на фиг. 3(a) относятся к фоновым солям в растворе. (b) На графике показано изменение поглощающей способности раствора в случае холостой пробы (т. е. 50 mM боратного буфера, pH 8,5, дополненного индикаторным соединением EBT), измеренное на лабораторном спектрометре для измерения поглощающей способности, по мере постепенного добавления HDBr в раствор в процессе титрования. С увеличением концентрации HDBr поглощающая способность индикатора при 665 нм уменьшается с сопутствующим сдвигом максимума поглощающей способности от приблизительно 630 до 593 нм.

Фиг. 4. Кривые титрования, на которых отображена нормализованная поглощающая способность с коррекцией на объем при 665 нм для серии стандартных растворов PVS.

Фиг. 5. (a) График зависимости поглощающей способности раствора с коррекцией на объем при 665 нм от массы HDBr (титрующего вещества) для трех разных стандартов PVS, приготовленных в холостом образце матрицы для MES. (b) Результаты сравнения точек перегиба кривой титрования для стандартов PVS, полученных в 50 mM борате натрия (треугольники), и MES, смешанного с 50 mM боратом натрия (черные квадраты).

Фиг. 6. Результаты сравнения точек перегиба кривой титрования для стандартов PVS, полученных в холостом образце матрицы для MES (черные квадраты), отрицательной контрольной партии MES (ромб) и партии MES, что обуславливало недостоверные результаты анализа qPCR (партия № I; круг).

Фиг. 7. Репрезентативный профиль для титрования холостого стандарта (100 mM карбонатный буфер, дополненный 1,25 мкг/мл индикатора EBT) с 0,04 мг/мл HDBr (черный контур) и соответствующей первой производной (светлый контур).

Фиг. 8. (a) График объема конечной точки титрования в зависимости от концентрации PVS, добавляемого в 50 mM MES, растворенного в 100 mM карбонатном буфере. (b) График зависимости объема конечной точки титрования от концентрации PVS для стандартных образцов, полученных в 100 mM карбонатном буфере.

Фиг. 9. Репрезентативные кривые титрования для (A, B) стандартных растворов PVS, полученных при 0 (A) или 0,75 (B) мкг/мл в 100 mM карбонатном буфере; и (C, D) PVS, добавляемого при 0 (C) или 0,70 (D) мкг/мл в 50 mM MES (образец H в табл. 2), приготовленного в 100 mM карбонатном буфере.

Фиг. 10. Представлены графики объема конечной точки титрования в зависимости от концентрации PVS. A) представляет собой график объема конечной точки титрования в зависимости от концентрации PVS для стандартных образцов, приготовленных в 100 mM карбонатном буфере. B) представляет собой график объема конечной точки титрования в зависимости от концентрации PVS, добавляемого в 50 mM натриевую соль MES, растворенную в 100 mM карбонатном буфере.

Подробное описание

Полианионные соединения, такие как поли(винилсульфонат) (PVS), являются полимерными примесями в буферных растворах Гуда, таких как буфер MES. Такие полианионные соединения, например PVS, присутствуют в таких буферах в низких количествах в диапазоне частот на миллион по отношению к буферному соединению, такому как MES. Присутствие этих примесей в буферных растворах Гуда представляет собой существенное опасение, поскольку такие буферы используются в изготовлении терапевтических белков, а эти примеси, и в частности PVS, являются активными ингибиторами полимеразы, которые могут вмешиваться в количественную ПЦР (qPCR) для обнаружения ДНК. Измерения в отношении нуклеиновых кислот клетки-хозяина (например, ДНК) в составах терапевтических белков, очищенных от культуры, или в составах других терапевтических соединений, регулярно необходимы для оценки безопасности терапевтических средств, предназначенных для введения людям. Существенной проблемой при использовании методик на основе ПЦР для обнаружения и количественного определения нуклеиновой кислоты клетки-хозяина в терапевтических составах является наличие ингибиторов ферментов нуклеиновой кислоты во многих буферах (например, в буферных растворах Гуда), используемых при очистке белков, таких как биопрепараты и биоаналоги, от клеточных культур. Скорость, точность и воспроизводимость основанных на ПЦР способов обнаружения и количественного определения уровней нуклеиновых кислот клеток-хозяев в этих составах привела к тому, что в данной области техники возникла существенная потребность в идентификации и удалении ингибиторов ферментов нуклеиновых кислот, например, РНК-ферментов, участвующих в ПЦР. Таким образом, присутствие полианионных соединений, таких как PVS, в буферных растворах Гуда, таких как MES, может вызывать несоответствие

партий терапевтического(их) белка(ов) или другого(их) терапевтического(их) соединения(й) критериям приемлемости для введения человеку, поскольку они мешают обнаружению ДНК клетки-хозяина методом qPCR.

В данном документе раскрыты способы, включающие титрование, основанное на комплексообразовании аналита (например, PVS) с противоположно заряженным титрующим веществом с высоким молекулярным весом. Такое взаимодействие приводит к чрезвычайно высокой равновесной константе ассоциации (K_a), а конечная точка может быть обнаружена электрохимическим или спектроскопическим путем (например, колориметрически, фотометрически, флуориметрически, рамановской или FTIR-спектроскопией). Краткое описание схемы обнаружения, примененной к титрованию PVS с бромидом гексаметрина (HDBr), иллюстративным титрующим веществом, представлено на фиг. 3.

Получали девять партий коммерческого буфера MES и подвергали анализу с помощью описанного в данном документе способа титрования для выявления и измерения уровня PVS. Сравнительные оценки данных партий буфера MES проводили с использованием раскрытого способа титрования для выявления и измерения уровня PVS и с использованием qPCR. Как видно из экспериментальных данных, данный способ дает возможность осуществлять чувствительное выявление низких уровней PVS и безошибочно и точно выявлять изменение уровней PVS среди партий. Такие анализы позволили обнаружить коммерческую партию буфера MES (партия № 1), содержащую существенно высокий уровень PVS, что согласуется с наблюдениями изменчивости среди партий ассоциированного с буфером ингибирования загрязнения биологических образцов нуклеиновой кислотой клетки-хозяина, которое обнаруживают методом ПЦР (например, qPCR).

Данные, приведенные в следующих примерах, показывают, что способ титрования выявления и измерения PVS в образцах с использованием поликатионного соединения, такого как бромид гексаметрина (т. е. HDBr), является высокоселективным для PVS по сравнению с MES, с $K_{a, PVS} \gg K_{a, MES}$, где K_a представляет собой равновесную константу ассоциации для реакции комплексообразования между титрующим веществом (HDBr) и либо PVS ($K_{a, PVS}$), либо MES ($K_{a, MES}$). Результаты, раскрытые в данном документе, показывают, что раскрытый способ титрования является воспроизводимым (точным) и дает возможность выявлять низкие уровни полианионов, например PVS, в буферных растворах Гуда, таких как MES, с пределом количественного определения (т.е. LOQ) приблизительно 100-200 нг/мл.

Раскрытый в данном документе протокол описывает подход к титрованию полиэлектролитов для количественного определения полианионов, таких как поли(винилсульфонат) (PVS) в буферных растворах Гуда, таких как буфер 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES). Методика может быть распространена на другие буферные растворы Гуда (например, HEPES), полученные из винилсульфоновой кислоты. Механизм выявления PVS основан на связывании с поликатионными видами, бромидом гексаметрина (HDBr). Схема реакции связывания представлена на фиг. 3а. В данном подходе используют высокую равновесную константу ассоциации (K_a) между PVS и HDBr для селективности в сравнении с MES, т. е. моноанионом. Действительно, K_a между поликатионом и полианионом резко возрастает с увеличением количества несущих заряд участков (положительно коррелирует с молекулярным весом полимера). В конечной точке титрования избыток HDBr связывается с анионным индикаторным соединением, эриохромом черным Т (ЕСВТ), что приводит к сдвигу в профиле поглощения в УФ-видимой области индикатора (фиг. 3б). За ходом титрования можно следить на одной длине волны (т. е. 665 нм) и соотносить его с концентрацией PVS в образце, например, путем вычисления точки перегиба полученной сигмоидальной кривой, как показано на фиг. 2.

Примеры

Пример 1.

Материалы и способы.

Приблизительно 30 вес.% натриевой соли поли(винилсульфоновая кислота) (PVS) приобретали у Sigma-Aldrich (# 278424) и Alfa Chemistry (# ACM25053274) и разбавляли с получением стандартных PVS известной концентрации в диапазоне от 0,1 до 20 мкг/мл. 50 мМ боратный буфер (pH 8,5) получали с помощью традиционных методик. 100 мМ карбонатный буфер (pH 10,0) получали из карбоната натрия (Sigma-Aldrich # 223484) и бикарбоната натрия (Sigma-Aldrich # S6014). Карбонатный и бикарбонатный буферы дополняли посредством приблизительно 0,1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA; MP Biomedicals # 06133713). Полиметобромид 1,5-диметил-1,5-диазаундекаметилена (бромид гексаметрина; HDBr) приобретали у Sigma-Aldrich (# 107689) и Carbosynth (# FH165280). Эриохром черный Т (ЕВТ или ЕСВТ) приобретали у Sigma-Aldrich (# 858390). Все растворы готовили с использованием воды, очищенной до минимального удельного сопротивления 18 МОм·см. 100 мМ раствор гидрата MES очищали от PVS посредством фильтрации через 0,2 мкм фильтр Posidyne® (площадь поверхности 2,8 см²), и раствор служил в качестве холостого образца для примера 1.

Буферы для анализа, полученные в соответствии с процедурой, описанной выше, обеспечивали получение буфера А, содержащего 50 мМ бората натрия, с pH, доведенным до 8,5 с помощью хлороводородной кислоты, и буфера В, содержащего 100 мМ объединенного карбоната и бикарбоната натрия, составленные для получения раствора с pH 10,0. Индикаторное соединение или раствор красителя, напри-

мер эриохром черный Т (ЕСВТ; 55 вес.%), служили в качестве индикаторного соединения. В случае, когда индикаторным соединением был ЕСВТ, аликвоту твердого вещества данного материала хранили при комнатной температуре. Для получения иллюстративного раствора красителя ЕСВТ 125 мг ЕСВТ вносили в 25-мл мерную колбу и регистрировали фактическую массу. ЕСВТ растворяли в 25 мл деионизированной (т.е. DI) воды и хранили в виде аликвот объемом 1 мл в полипропиленовых микроцентрифужных пробирках объемом 1,6 мл при температуре 2-8°C до использования. Поликатионное соединение, используемое в раскрытых способах, представляет собой титрующее вещество, и иллюстративный раствор титрующего вещества получали с использованием HDBr. Этот материал хранили при 2-8°C. Для получения раствора взвешивали 18,7 мг HDBr непосредственно в стеклянном флаконе и растворяли в 3,74 мл воды с получением 5 мг/мл исходного раствора. Затем готовили 0,05 мкг/мл титрующих веществ HDBr путем разведения 1:20 или 1:100 соответственно раствора 5 мг/мл HDBr в 50 мМ боратном буфере, дополненном 0,1 мМ EDTA. Данный раствор использовали в качестве титрующего раствора для раскрытых в данном документе способов анализа. Титрующие растворы HDBr готовили в виде растворов объемом по 10 мл в 15-мл полипропиленовых центрифужных пробирках и хранили при 2-8°C.

Получение стандартов.

Для получения аналитических стандартов использовали коммерческий маточный раствор поливинилсульфоната (PVS) (Alfa Chemistry, 25 вес.%, натриевая соль, партия № A19X05191) путем серийных разведений исходного раствора в воде. Растворы PVS из табл. 1 затем добавляли в 50 мМ боратный буфер (дополненный 0,1 мг/мл EDTA) для приготовления стандартов с известной концентрацией PVS.

Таблица 1

Коэффициент разбавления исходного PVS	V _{Вода} (мл)	V _{Стандарт} (мл)	Используемое разбавление	Приблизительное количество [PVS] (мкг/мл)
1:20	0,950	0,050	Исходное	12500
1:400	0,950	0,050	1:20	625
1:2000	0,800	0,200	1:400	125
1:10000	0,800	0,200	1:2000	25

Исходные растворы и растворы стандартов хранили при температуре 2-8°C.

Получение образцов

100 мМ растворы гидрата MES (партии № I и II) с рН, доведенным до 7,00±0,05, получали следующим образом. 2,132 г гидрата MES растворяли в 95 мл воды, рН регулировали с помощью водного NaOH, после чего раствор доводили до конечного объема 100 мл водой. рН измеряли с помощью традиционного рН-метра. Растворы хранили при температуре 2-8°C.

Процедура анализа.

Хотя эксперименты по осуществимости титрования проводили с использованием простого протокола, описанного ниже, такие эксперименты можно было автоматизировать с помощью фотометрического прибора для титрования для автоматизации описанных в данном документе стадий. Лампы УФ и видимого спектра для спектрометра перед использованием прогревали в течение по меньшей мере 20 мин путем включения спектрометра. Перед каждым анализом спектрометр калибровали холостыми образцами, используя либо растворы стандартов, либо растворы образцов. Стандартная ячейка, используемая в раскрываемом анализе, представляла собой кварцевую кювету шириной 10 мм и объемом 1,5 мл. Стандарт состоит из PVS, разведенного в аналитическом буфере. Образец готовили путем смешивания 100 мМ MES в качестве иллюстративного буферного раствора Гуда с буфером для анализа. Данную стадию выполняют потому, что иллюстративное индикаторное соединение ЕСВТ претерпевает изменение цвета при значениях рН 6-7, тогда как значения рН, превышающие 7, находятся выше области буферного действия раствора для MES. Поэтому MES смешивали с основными буферами, т.е. А или В, которые описаны выше, для обеспечения депротонирования индикатора ЕСВТ.

В изначальных экспериментах смешивали буфер А и MES в соотношении 1:1. Ожидается, что более основные буферы (например, В и С), смешанные с MES в различных объемных соотношениях, будут повышать эффективность анализа.

После калибровки спектрометра холостыми пробами к стандарту/образцу добавляли небольшой объем раствора ЕСВТ. Изначально 995 мкл стандарта/образца смешивали с 5 мкл ЕСВТ (5 мг/мл), получая конечную концентрацию ЕСВТ, составляющую 25 мкг/мл. Получали результаты полноволнового сканирования в отношении поглощающей способности. Раствор стандарта/образца титровали путем внесения в кювету небольших объемов (10-100 мкл) раствора HDBr с концентрацией 0,050 мг/мл, измерения поглощающей способности образца между каждым внесением HDBr. Для смешивания раствора использовали 200-мкл пипетку и перед измерением поглощающей способности раствор оставляли отстаиваться на приблизительно 1 мин. В ходе титрования постепенно увеличивали объем HDBr. Например, сначала производили малообъемные (например, 10 мкл) внесения, поскольку в начале титрования профиль поглощающей способности претерпевал резкие изменения. Позже при титровании вносили объемы большего размера, когда на изменение поглощающей способности в большей степени влияло разведение.

В некоторых случаях (например, для растворов с большими концентрациями PVS), использовали более концентрированный 0,25 мг/мл раствор HDBг. Предшествующие стадии проведения холостого опыта на спектрофотометре и добавления небольшого объема раствора красителя к стандарту/образцу затем повторяли для каждого образца.

Анализ данных.

Из данных УФ-видимых спектров строили график поглощающей способности при длине волны 665 нм в зависимости от массы внесенного HDBг (в мкг). Поглощающую способность необходимо скорректировать по изменению объема раствора с учетом разведения, что осуществляли путем умножения A_{665} нм на общий объем раствора (т.е. изначальный объем раствора [1,000 мл] плюс совокупный объем внесенного титрующего раствора).

На фиг. 4 и 5 подытожены результаты оценки. На фиг. 4 представлена поглощающая способность раствора с поправкой на объем при длине волны 665 нм по отношению к массе титрующего вещества HDBг для аналитического буфера с добавлением трех различных уровней PVS.

На фиг. 5а представлена нормализованная поглощающая способность раствора с коррекцией на объем при 665 нм по отношению к массе титрующего вещества HDBг для холостого образца матрицы для MES с добавлением трех различных уровней PVS. Как для стандарта PVS 0 ppm, так и для холостого образца (т.е. холостого MES), добавление титрующего вещества вызывало первоначальный спад A_{665} , который стабилизировался после добавления в раствор приблизительно 5,00 мкг HDBг. Оставшиеся стандарты и образцы PVS, которые готовили путем добавления в раствор коммерческого PVS, требовали большего количества титрующего вещества для достижения установившейся поглощающей способности. Например, образец 7,5 ppm (фиг. 5а) достигал стабильности A_{665} только после добавления более 40 мкг HDBг. В совокупности такие данные указывают на четкие различия в кривых титрования (фиг. 4 и 5а), связанные с количеством PVS в растворе образца. На фиг. 5б кратко представлена эта зависимость путем построения графика рассчитанной точки перегиба для стандартных растворов PVS, приготовленных в 50 мМ боратном буфере (pH 8,5) (зеленый треугольник) или MES, в который добавляли PVS, а затем смешивали с 50 мМ боратным буфером (pH 8,5) для регулирования pH раствора (черные квадраты). Угловые коэффициенты для двух наборов данных были сопоставимы, что свидетельствует о том, что присутствие MES в высокой концентрации (100 мМ) не препятствовало количественному определению PVS. Кроме того, эти данные подтверждают обнаружение PVS при концентрациях до 1,5 ppm (мкг/мл) в 100 мМ растворе MES и 0,3 ppm в буфере для анализа.

Для дополнительной оценки эффективности процедуры титрования оценивали две разные партии MES вместе со стандартами PVS. Партию гидрата MES (образец I), которая приводила к недостоверным результатам qPCR для нескольких продуктов, сравнивали с другим образцом MES, который содержал минимальное количество PVS для анализа qPCR (т.е. тот же материал, который использовали для создания холостого образца на фиг. 5). Результаты такой оценки, представленные на фиг. 6, показывали измеримое количество PVS, присутствующее в образце MES I, но не в отрицательном контрольном материале MES, который был неотличим от холостого образца матрицы, лишённого PVS. Данные результаты позволяют установить, что раскрываемая методология позволяет точно определить материалы гидрата MES с неподходящими уровнями PVS. Более того, материалы гидрата MES без PVS или с промежуточными уровнями PVS, которые не будут препятствовать qPCR, отличаются от непригодных материалов MES.

Пример 2.

Автоматическое титрование.

Автоматическое титрование растворов стандартов PVS и образцов MES проводили на приборе Metrohm 907 Titrando, оснащенном приводом дозирования с интеллектуальным управлением (№ 2.800.0010) и дозирующим устройством с объемной емкостью 20 мл (№ 6.303.2200). 100 мл раствора стандарта или образца дополняли посредством 0,8-1,7 мкг/мл индикатора EBT (например, путем добавления 0,5-1,0 мг/мл маточного раствора EBT) непосредственно перед титрованием. Полученный раствор анализировали путем монотонного титрования образца HDBг с приращением по объему 50-150 мкл, при этом сигнал от фотометрического зонда оставляли стабилизироваться между приращениями дозы. Прогресс титрования отслеживали путем непрерывного измерения поглощающей способности раствора образца при 660 нм с помощью погружного фотометрического зонда (Optrode, № 6.1115.000), при этом конечную точку титрования определяли с помощью максимального значения dU/dV на первой производной кривой титрования.

Репрезентативный профиль титрования для холостого стандарта представлен на фиг. 7 (черный контур) рядом с соответствующей первой производной (красный контур). Объем, при котором возникает максимум в первой производной (т.е. $V_{\text{титрующее вещество}}$ приблизительно 0,55 мл на фиг. 7), соответствует конечной точке титрующего вещества и используется при определении концентрации PVS.

pH раствора образца играет важную роль в измерении PVS либо за счет влияния плотности анионного заряда на аналит PVS, либо косвенно за счет протонирования индикаторного соединения с образованием одновалентного аниона (H_2In^-), который не претерпевает изменения в отношении поглощающей способности при образовании комплекса с HDBг. Эксперименты, описанные выше в примере 1, показали, что смешивание приготовленных растворов MES с щелочным буфером является целесообразным

подходом для обеспечения подходящего pH образца. Использование данного подхода в экспериментах по автоматическому титрованию (т. е. путем растворения образцов MES с концентрацией MES 50 мМ в 100 мМ карбонатном буфере) проверяли путем оценки обнаружения добавки PVS в растворах образцов MES. Для такой оценки 10 ppm исходного раствора PVS в разных концентрациях добавляли в растворы образцов гидрата MES (образец H; см. табл. 2). Этот материал при анализе методом титрования без дополнительного добавления PVS в образец обеспечивал объемы конечной точки, неотличимые от холостого стандарта, что указывает на уровень PVS ниже предела выявления согласно способу.

Результаты для оценки обнаружения добавки представлены на фиг. 8а, где на графике показан объем конечной точки титрования в зависимости от концентрации PVS на четырех разных уровнях PVS (каждый анализ проводили в трех повторностях). Для сравнения, результаты для стандартов PVS, приготовленных только в 100 мМ карбонатном буфере, показаны на фиг. 8б. Для обоих наборов данных линейная регрессия между объемом конечной точки титрования и концентрацией PVS приводила к получению сходных угловых коэффициентов (0,99 и 0,95 мл/(мкг/мл)) с соответствующими линейными коэффициентами детерминации ($R^2=0,99$). Кроме того, визуальное изучение репрезентативных кривых титрования, показанных на фиг. 9 для стандартов PVS (фиг. 9А и 9В) и образцов для обнаружения добавки (фиг. 9С и 9D), не выявило ощутимого влияния пониженного pH или присутствия 50 мМ MES на профиль титрования. В совокупности эти результаты указывают на отсутствие заметного влияния более низкого pH образца или присутствия 50 мМ MES на измеряемые уровни PVS.

В ходе разработки процедуры титрования несколько партий гидрата MES оценивали на содержание PVS путем титрования 50 мМ MES (растворенного в 100 мМ карбонатном буфере) посредством 0,10 мг/мл HDBt. Конечные точки титрования сравнивали с результатами, полученными для ряда стандартных растворов PVS. Результаты таких исследований представлены в табл. 2. Среди данных образцов была партия гидрата MES (образец I), которая обуславливала невозможность проведения qPCR-анализа для нескольких партий терапевтического белка. Образец I характеризовался уровнем PVS, измеренным посредством титрования, составлявшим 71 ± 4 мкг PVS на 1 г гидрата MES, значение, значительно превышающее уровни PVS, измеренные для любого из других протестированных образцов, что подтверждает полезность титрования при скрининге материалов MES с неподходящими уровнями PVS. Стоит отметить, что для некоторых партий гидрата MES (т.е. E.1 и E.2, F.1 и F.2, H.1 и H.2) показаны различные итерации процедуры титрования. Например, E.1 представляет итерацию на основе одного повтора, а E.2 представляет итерацию на основе трех повторов.

Таблица 2
Образцы гидрата MES, оцениваемые в отношении PVS,
во время разработки способа титрования

Номер партии гидрата MES	[PVS] в 100 мл 50 мМ MES (мкг/мл)	[PVS], в пересчете на сухое вещество (мкг PVS/г гидрата MES)
A ^a	0,21±0,07	21±7
B ^a	0,38±0,18	39±19
C ^a	0,26±0,09	27±9
D ^b	0 ^c	0 ^c
E.1 ^b	0,14	14
E.2 ^a	0,28±0,08	29±8
F.1 ^b	0,25	25
F.2 ^a	0,23±0,03	24±3
G ^b	0,04	4
H.1 ^b	0 ^c	0 ^c
H.2 ^a	<0,16	<16
I ^a	0,71±0,04	71±4

^a Образцы оценивали в трех повторностях.

^b Образцы оценивали без повторных измерений.

^c Образец был ниже LOD 0,16 мкг/мл (16 мкг/г).

Пример 3.

Сравнение способов выявления.

Оценивали несколько способов выявления и измерения уровня поликатионов, таких как PVS, в образцах белков (например, биологических образцах). Способ координации ионов, включающий индуцированную агрегацию полиионного репортерного противоиона PVS с турбидиметрическим выявлением, является простым способом низкой сложности, но этот способ не смог надежно выявить партии буфера MES с высокими уровнями PVS. Способ на основе флуоресценции, включающий прямое выявление водного PVS посредством флуоресцентного возбуждения и выявления, был еще одним простым способом низкой сложности, но этот способ оказался неприменим для выявления PVS, поскольку PVS в растворе не является флуоресцентным, тогда как флуоресценция, ассоциированная с высушенными образцами PVS, была определена как неспецифический артефакт PVS, ассоциированный с высушенным образцом. Другой флуоресцентный способ, включающий индуцированное PVS гашение флуоресцентной репортерной молекулы, был более сложным и не показал себя многообещающим по причине ограниченной способности селективно выявлять PVS относительно MES. Способ, основанный на физических характеристиках полианионов, присутствующих в буферных растворах Гуда, представляет собой эксклюзионную хроматографию с выявлением заряженных аэрозолей (т.е. SEC-CAD). Данный способ давал возможность выявлять PVS в буферах MES, но данный способ значительно сложнее, чем другие способы. Оценивали еще один способ координации ионов, и было установлено, что этот способ, включающий комплексообразование полиэлектролитов и титрование с использованием длины волны в ультрафиолетовой и видимой областях спектра для выявления поглощения, обеспечивает неожиданно превосходные результаты в обеспечении чувствительного, точного и тщательного выявления и количественного определения PVS в буферных растворах Гуда, в том числе без ограничения в буферных растворах Гуда, представленных в табл. 3. Данный способ, раскрытый в данном документе как способ титрования, представляет собой простой способ с низкой сложностью и низкими затратами в дополнение к преимуществам точности, достоверности и чувствительности.

Таблица 3

Буферные растворы Гуда

БУФЕР	РК _A	БУФЕР	РК _A
MES	6,15	POPSO	7,85
БИС-ТРИС-МЕТАН	6,60	HEPPSO	7,9
ADA	6,62	EPS	8,0
БИС-ТРИС-ПРОПАН	6,80	HEPPS	8,1
PIPES	6,82	ТРИЦИН	8,15
ACES	6,88	ТРИС	8,2
MOPSO	6,95	ГЛИЦИНАМИД	8,2
ХЛОРИД ХОЛАМИНА	7,10	ГЛИЦИЛГЛИЦИН	8,2
MOPS	7,15	HEPBS	8,3
BES	7,17	БИЦИН	8,35
AMPB	8,8	TAPS	8,55
HEPES	7,55	AMPB	8,8
DIPSO	7,6	CHES	9,3
MOBS	7,6	CAPSO	9,6
АЦЕТАМИДОГЛИЦИН	7,7	AMP	9,7
TAPSO	7,6	CAPS	10,4
TEA	7,8	CABS	10,7

Пример 4.

Количественное определение PVS в полученных водных растворах натриевой соли MES.

Водные растворы натриевой соли MES, которые являются значительно более щелочными, чем растворы гидрата MES конъюгированной кислоты (например, pH приблизительно 10,0 и приблизительно 8,5 для растворов 50 мМ натриевой соли MES и гидрата MES в 100 мМ карбонатном буфере соответственно), также пригодны для определения PVS с использованием процедуры титрования, аналогичной той, которая представлена в примере 2. На фиг. 10B на графике нанесена конечная точка титрования, определенная фотометрически при 660 нм, для 50 мМ растворов натриевой соли MES, приготовленных в 100 мМ карбонатном буфере и с добавлением стандартного PVS. Для сравнения на фиг. 10A на графике показан объем конечной точки титрования в качестве функции концентрации PVS для стандартов, приготовленных только в 100 мМ карбонатном буфере. Для обоих наборов данных линейная регрессия между объемом конечной точки титрования и концентрацией PVS приводила к получению сходных угловых

коэффициентов (1,04 и 1,09 мл/(мкг/мл)) с линейными коэффициентами детерминации (R^2) 1,00. Важно отметить, что величина угловых коэффициентов обнаружения добавки как для образцов гидрата MES, так и натриевой соли MES, находилась в пределах типичной экспериментальной ошибки способа (т.е. не было заметной разницы в аналитическом сигнале между двумя типами образцов).

Каждый цитируемый патент или другая публикация прямо включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте или в соответствующей части, как это будет очевидно специалисту в данной области техники из контекста, при этом включение эффективно описывает и раскрывает, например, методики, описанные в таких публикациях, которые могут быть использованы в связи с информацией, раскрытой в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ титрования для выявления полианионного ингибитора ферментов в жидкости, включающий:

(а) приведение в контакт жидкости с известным количеством поликатионного соединения, где жидкость в качестве буфера содержит 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES);

(б) приведение в контакт материала из (а) с индикаторным соединением, где индикаторное соединение проявляет измененное свойство в свободной форме по сравнению с его формой при нахождении в комплексе с поликатионным соединением и где достаточное количество индикаторного соединения добавляют для выявления свободной формы индикаторного соединения при отсутствии комплексообразования;

(с) повторение (а) и

(д) выявление свободной формы индикаторного соединения в точке титрования, за счет чего выявляют полианионный ингибитор ферментов.

2. Способ по п.1, где получают множество образцов буфера, при этом каждый образец буфера характеризуется разной концентрацией буферного соединения, за счет чего получают серию разбавлений буфера.

3. Способ по любому из пп.1, 2, где предел выявления поливинилсульфоната (PVS) составляет 1,5 части на миллион буферного раствора, 0,25 части на миллион буферного раствора или 0,16 мкг/мл буферного раствора.

4. Способ по любому из пп.1-3, где конечная точка титрования представляет собой точку, где поглощающая способность образца находится посередине между начальной поглощающей способностью образца и установившейся поглощающей способностью или представляет собой локальный максимум первой производной кривой поглощающей способности образца.

5. Способ по любому из пп.1-4, где свободную форму индикаторного соединения выявляют электрохимическим или спектроскопическим путем.

6. Способ по п.5, где выявление с помощью спектроскопии включает колориметрическое выявление, фотометрическое выявление, флуориметрическое выявление, рамановскую или FTIR-спектроскопию.

7. Способ по любому из пп.1-6, где полианионный ингибитор ферментов представляет собой поливинилсульфонат (PVS) или его производное.

8. Способ по п.7, где полианионный ингибитор ферментов представляет собой поливинилсульфонат (PVS).

9. Способ по любому из пп.1-8, где поликатионное соединение представляет собой pH-независимое поликатионное соединение или pH-зависимое поликатионное соединение.

10. Способ по п.9, где pH-независимое поликатионное соединение представляет собой полимер на основе четвертичного аммония.

11. Способ по п.9, где pH-зависимое поликатионное соединение представляет собой полиамин.

12. Способ по п.10, где полимер на основе четвертичного аммония представляет собой бромид гексадиметрина (HDBr), хлорид поли(диаллил)диметиламмония (pDADMAC) или метилгликольхитозан.

13. Способ по п.10, где полимер на основе четвертичного аммония представляет собой бромид гексадиметрина (HDBr).

14. Способ по п.13, где к жидкости добавляют несколько аликвот HDBr, в совокупности составляющих по меньшей мере 0,1% от общего объема жидкости.

15. Способ по п.12, где полимер на основе четвертичного аммония представляет собой хлорид поли(диаллил)диметиламмония (pDADMAC).

16. Способ по любому из пп.1-15, где индикаторное соединение представляет собой краситель.

17. Способ по п.16, где краситель представляет собой азокраситель.

18. Способ по п.17, где азокраситель представляет собой эриохром черный Т (ЕСВТ), эриохром сине-черный R (Calcon) или натриевую соль сульфазо.

19. Способ по п.18, где азокраситель представляет собой эриохром черный Т (ЕСВТ).

20. Способ по п.19, где 0,8-1,7 мкг ЕСВТ добавляют на 1 мл жидкости, содержащей известное ко-

личество поликатионного соединения.

21. Способ по любому из пп.1-20, дополнительно включающий определение концентрации полианионного ингибитора ферментов из количества поликатионного соединения, необходимого для титрования полианионного ингибитора ферментов.

22. Способ по п.21, дополнительно включающий сравнение результатов с результатами, полученными с помощью стандартной кривой полианионного ингибитора ферментов, за счет чего определяют концентрацию полианионного ингибитора ферментов в жидкости.

23. Способ по любому из пп.1-22, где способ является автоматизированным.

24. Автоматизированный способ титрования для выявления полианионного ингибитора ферментов в жидкости, включающий:

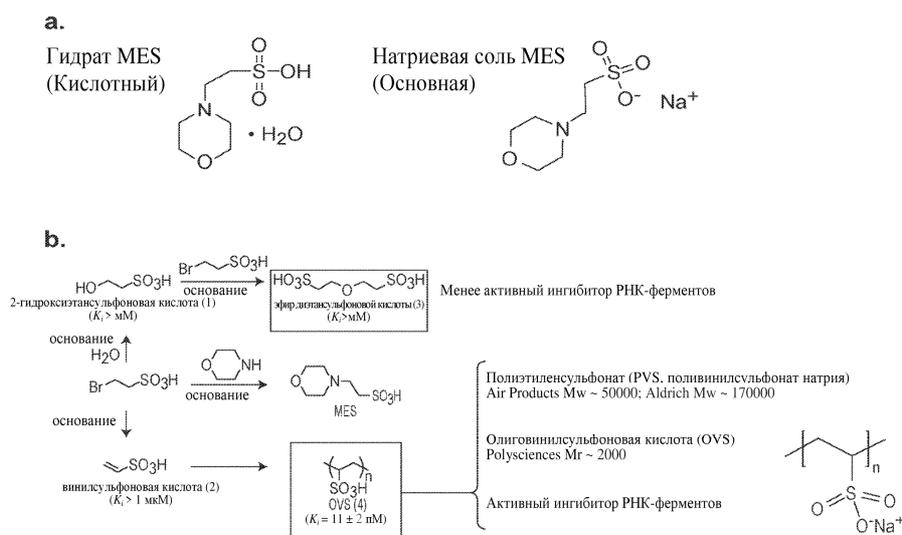
(а) объединение жидкости с индикаторным соединением, где жидкость в качестве буфера содержит 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), где индикаторное соединение проявляет измененное свойство в свободной форме по сравнению с его формой при нахождении в комплексе с поликатионным соединением и где достаточное количество индикаторного соединения добавляют для выявления свободной формы индикаторного соединения при отсутствии комплексообразования;

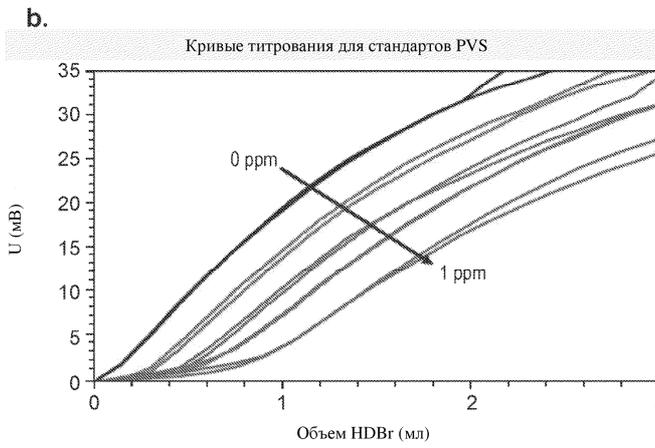
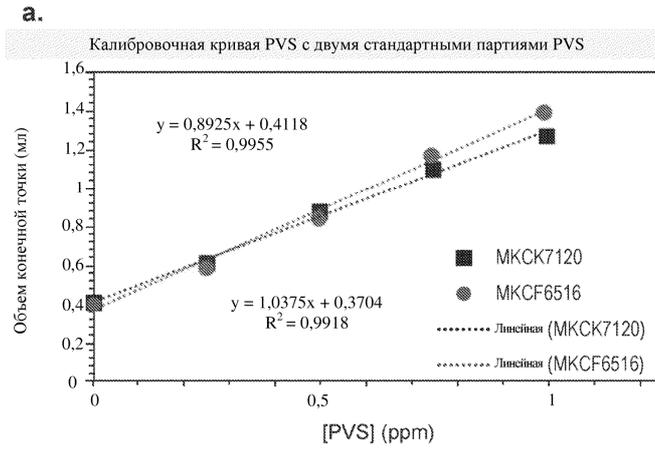
(b) приведение в контакт материала из (а) с известным количеством поликатионного соединения;

(с) измерение поглощающей способности жидкости, содержащей индикаторное соединение и поликатионное соединение, с применением прибора для титрования;

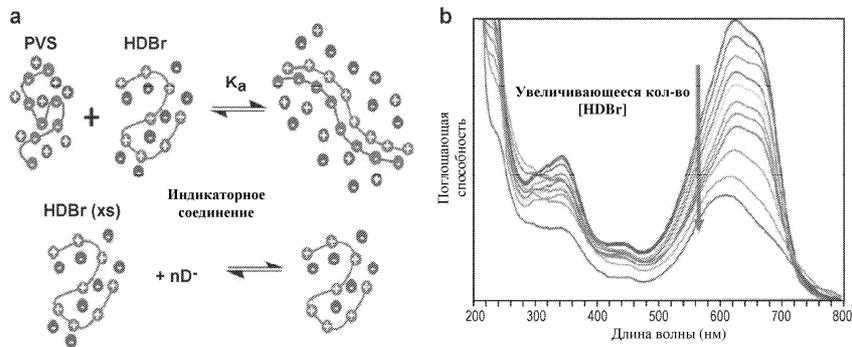
(d) автоматическое повторение (b) и (с), где выявление свободной формы индикаторного соединения обеспечивает выявление полианионного ингибитора ферментов.

25. Способ по п.24, где прибор для титрования содержит насос, такой как шприцевой насос или дозирующий привод с интеллектуальным управлением, в сообщении по текучей среде с поликатионным соединением и жидкостью.

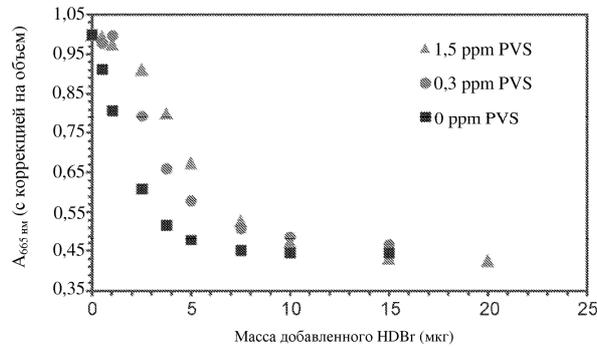




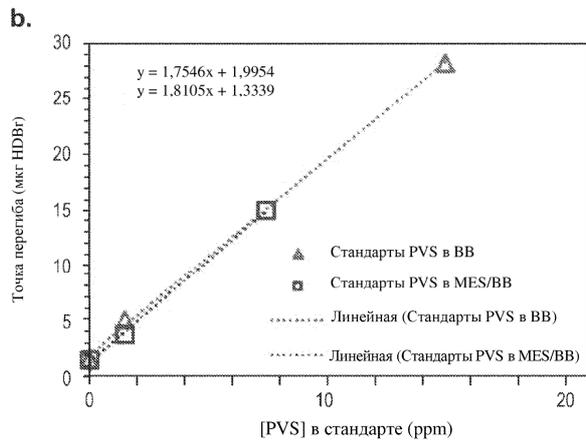
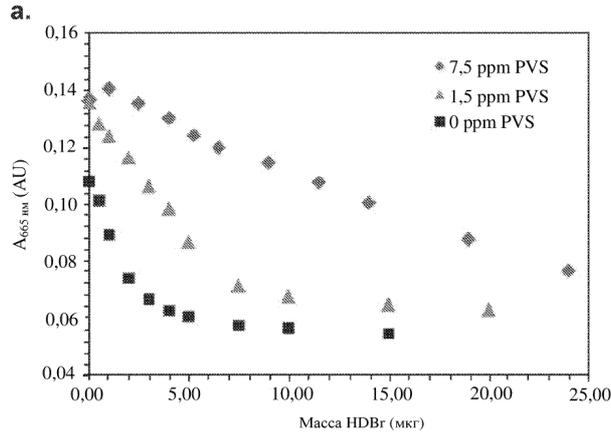
Фиг. 2



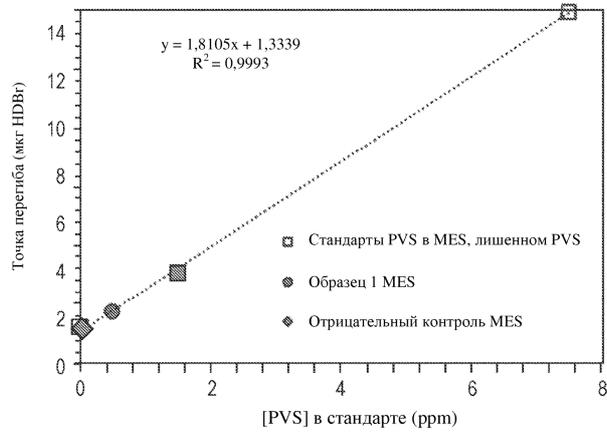
Фиг. 3



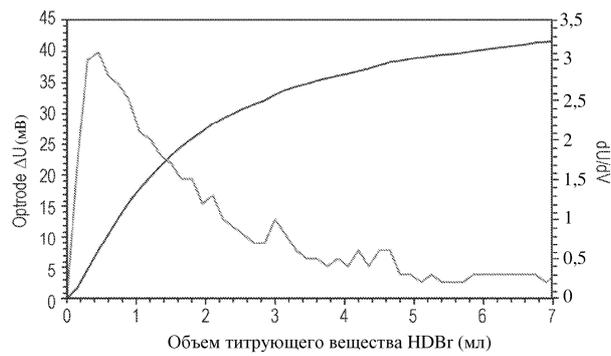
Фиг. 4



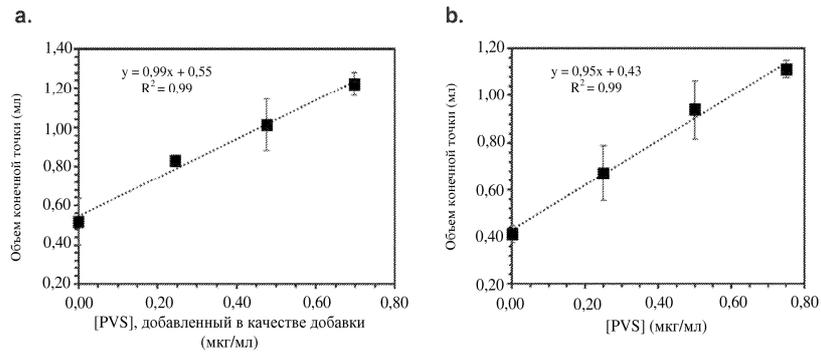
Фиг. 5



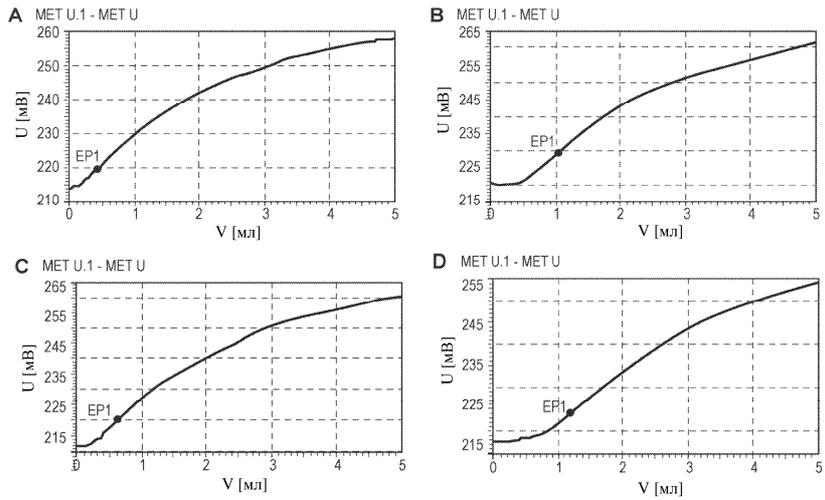
Фиг. 6



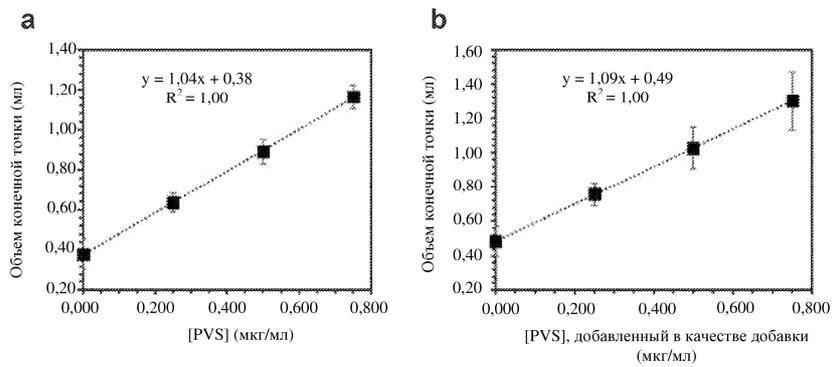
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

