

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043925**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.06

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)

(21) Номер заявки
202090380

(22) Дата подачи заявки
2018.08.01

(54) СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АНАЛИЗА ГЛИКАНОВ В ОБРАЗЦЕ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

(31) 62/539,798

(32) 2017.08.01

(33) US

(43) 2020.05.21

(86) PCT/US2018/044891

(87) WO 2019/028191 2019.02.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
У Чао-Сиан (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2012037407

CAROLIN HUHN ET AL.: "IgG glycosylation analysis", PROTEOMICS, vol. 9, no. 4, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 882-913, XP055511265, DE, ISSN: 1615-9853, DOI: 10.1002/pmic.200800715, sections 4.4.1-4.4.2

M.M. ST. AMAND ET AL.: "Development of at-line assay to monitor charge variants of MAbs during production", BIOTECHNOLOGY PROGRESS., vol. 30, no. 1, 30 December 2013 (2013-12-30), pages 249-255, XP055509809, US ISSN: 8756-7938, DOI: 10.1002/btpr.1848, abstract; figure 1

US-A1-2014030732
WO-A1-2009027041

(57) В изобретении представлены системы и способы, которые содействуют автоматической (или практически полностью автоматической) подготовке образца продукта, содержащего полипептиды, для анализа гликанов и автоматическому (или практически полностью автоматическому) выполнению анализа гликанов в таком образце. Таким образом, подготовку и анализ можно выполнять практически в режиме реального времени или, другими словами, намного быстрее, чем обеспечивается с помощью традиционных систем и способов в настоящее время.

B1

043925

**043925
B1**

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США № 62/539798 под названием "Systems and Methods for Performing a Real-Time Glycan Assay of a Sample" и поданной 1 августа 2017 г., полное раскрытие которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к анализам гликанов и, более конкретно, к выполнению анализа гликанов в образце в режиме реального времени.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка подается с перечнем последовательностей в электронной форме. Перечень последовательностей предоставлен в виде файла под названием "51970_Seqlisting.txt", созданного 31 июля 2018 г. и имеющего размер 263980 байт. Информация о перечне последовательностей в электронной форме включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Уровень техники

Анализы обычно выполняют для количественной оценки одного или нескольких параметров анализа, такого как лекарственное средство, биохимическое вещество или клетка. Примером такого анализа является анализ на основе многопараметрового способа (MAM), с помощью которого можно обнаруживать и количественно оценивать критические параметры качества (CQA) образца, идентифицированные в целевом профиле качества препарата (QTPP) (Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics. Rogers R.S., Nightlinger N.S., Livingston B., Campbell P., Bailey R., Balland A. MABs. 2015; 7(5): 881-90). MAM-анализ представляет собой проводимый вручную процесс, выполняемый, например, в лаборатории по контролю готовой продукции высокомолекулярных соединений (LMRT). MAM представляет собой способ картирования пептидов на основе жидкостной хроматографии (LC) - масс-спектрометрии (MS), имеющий три стадии: (1) подготовки образца (которая может включать, например, денатурацию, восстановление, алкилирование и расщепление полипептидов); (2) разделения расщепленных полипептидов с помощью LC и их обнаружения с помощью MS и (3) анализа данных относительно целевых CQA и обнаружения нового сигнала (т.е. пиков) при сравнении с эталонным стандартом.

CQA представляют собой химические, физические или биологические свойства, которые находятся в пределах специфического значения или диапазона значений. Например, в случае терапевтических молекул, представляющих собой крупные полипептиды, важными CQA являются физические параметры и модификации аминокислот (структурных элементов полипептидов), которые отслеживают в ходе и после получения, а также во время разработки лекарственного средства. В отличие от традиционных аналитических методов, в которых отслеживаются изменения размера пика и формы пика целых полипептидов или их частей, MAM обнаруживает специфические CQA на аминокислотном уровне.

Например, зачастую CQA является анализ гликанового профиля полипептидного терапевтического средства. Это особенно справедливо в случае биоэквивалентных продуктов, когда профиль гликозилирования биоэквивалентного продукта должен быть сопоставим с профилем инновационного продукта. В случае известных способов выполнения анализов гликанов требуется, чтобы образец продукта был собран вручную, доставлен в лабораторию по тестированию и сконцентрирован, очищен, например, и подготовлен для анализа вручную. Обычное время осуществления этих известных, проводимых вручную, способов составляет приблизительно пять дней. Этот промежуток времени ведет к затратам и задержкам в разработке лекарственных средств (инновационных и биоэквивалентных) и конечном выпуске лекарственных средств. Например, во время разработки лекарственного средства эти задержки в пять дней накапливаются, например, при оптимизации условий культивирования для обеспечения оптимального гликозилирования, что задерживает снабжение пациентов важными и новыми полипептидными фармацевтическими средствами. Более того, такие задержки приводят к тому, что профили, определенные после изготовления, влекут за собой необходимость повторного изготовления продуктов, которые не соответствуют спецификациям, в отличие от корректировки параметров производства в режиме реального времени. Таким образом, существует потребность в эффективных и более быстрых способах, содействующих проведению анализу гликанов, включая подготовку образцов для таких анализов.

Краткое описание

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ подготовки образца в режиме реального времени для анализа гликанов. Способ предусматривает стадии: (a) перемещения образца, содержащего полипептиды, в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик; (b) связывания полипептидов в образце с колонкой для связывания полипептидов; (c) перемещения гликанов в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик для высвобождения гликанов из связанных полипептидов; (d) перемещения раствора-носителя в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик и через колонку для связывания полипептидов, за счет чего осуществляется перемещение высвобожденных гликанов из первой колонки для полипептидов; (e) смешивания высвобожденных гликанов с реагентом для мечения гликанов после колонки для связывания полипептидов; (f) перемещения смеси высвобожденных гликанов и реагента для мечения гликанов в реакционный змее-

вик, смонтированный после колонки для связывания полипептидов; (g) инкубирования смеси высвобожденных гликанов и реагента для мечения гликанов в реакционном змеевике, за счет чего осуществляется мечение гликанов; (h) перемещения смеси в охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционного змеевика; (i) снижения температуры смеси с помощью охлаждающего змеевика; (j) перемещения охлажденной смеси в колонку для связывания гликанов, смонтированную после охлаждающего змеевика; (k) связывания меченых гликанов с колонкой для связывания гликанов и (l) перемещения элюирующего буфера в колонку для связывания гликанов и через колонку для связывания гликанов с элюированием меченых гликанов, связанных с колонкой для связывания гликанов.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ подготовки образца в режиме реального времени для анализа гликанов в закрытой системе, включающей многопортовый клапан, удерживающий змеевик до многопортового клапана, колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с первым портом многопортового клапана и смонтированную после него, реакционный змеевик, смонтированный после колонки для связывания полипептидов, охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционного змеевика, и колонку для связывания гликанов, смонтированную после охлаждающего змеевика, а также соединенную по текучей среде со вторым портом многопортового клапана и расположенную после него. Способ предусматривает: (a) перемещение, под управлением контроллера, связанного коммуникационным взаимодействием с закрытой системой, образца, содержащего полипептиды, из резервуара, содержащего полипептиды, в удерживающий змеевик; (b) установку, под управлением контроллера, многопортового клапана в первое положение, при котором удерживающий змеевик соединен по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов через первый порт многопортового клапана, так что образец перетекает в колонку для связывания полипептидов, в результате чего практически все полипептиды в образце связываются с первой колонкой для полипептидов; (c) когда многопортовый клапан находится в первом положении, перемещение, под управлением контроллера, гликаназ в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик для высвобождения гликанов из связанных полипептидов, а затем перемещение, под управлением контроллера, раствореносителя в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик и сквозь колонку для связывания полипептидов, за счет чего высвобожденные гликаны перемещаются из колонки для связывания полипептидов; (d) перемещение, под управлением контроллера, высвобожденных гликанов в направлении реакционного змеевика; (e) перемещение, под управлением контроллера, реагента для мечения гликанов в направлении высвобожденных гликанов перед их попаданием в реакционный змеевик, так что реагент для мечения гликанов смешивается с высвобожденными гликанами и ферментами; (f) перемещение, под управлением контроллера, смеси в реакционный змеевик, в результате чего происходит мечение гликанов в смеси; (g) перемещение, под управлением контроллера, смеси в охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционной спирали, за счет чего температура смеси снижается; (h) перемещение, под управлением контроллера, охлажденной смеси в колонку для гликанов, смонтированную после охлаждающего змеевика, в результате чего практически все меченые гликаны связываются с колонкой для связывания гликанов; (i) установку, под управлением контроллера, многопортового клапана во второе положение, при котором колонка для связывания гликанов соединена по текучей среде с источником раствора элюирующего буфера через второй порт многопортового клапана; (j) когда многопортовый клапан находится во втором положении, перемещение, под управлением контроллера, элюирующего буфера из источника элюирующего буфера в колонку для связывания гликанов и сквозь колонку для связывания гликанов, за счет чего элюируются гликаны, связанные с колонкой для связывания гликанов; и (k) перемещение, под управлением контроллера, элюированных гликанов в устройство для анализа гликанов.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрена закрытая система для подготовки образца в режиме реального времени для анализа гликанов. Закрытая система включает многопортовый клапан, удерживающий змеевик до многопортового клапана, колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с первым портом многопортового клапана и расположенную после него, реакционный змеевик, смонтированный после колонки для связывания полипептидов, охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционной спирали, колонку для связывания гликанов, соединенную по текучей среде с охлаждающим змеевиком и расположенную после него, колонку для связывания гликанов, соединенную по текучей среде с многопортовым клапаном через второй порт многопортового клапана, и контроллер, связанный коммуникационной связью с многопортовым клапаном. Контроллер включает запоминающее устройство, процессор и алгоритм, хранимый в накопителе и исполняемый процессором для: (a) перемещения образца продукта, содержащего полипептиды, в удерживающий змеевик; (b) установки многопортового клапана в первое положение, при котором удерживающий змеевик соединен по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов через первый порт многопортового клапана, так что образец перетекает в первую колонку, в результате чего практически все полипептиды в образце связываются с колонкой для связывания полипептидов; (c) когда многопортовый клапан находится в первом положении, перемещения гликаназ в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик для высвобождения гликанов из связанных полипептидов, а затем перемещения раствореносителя в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик и сквозь колонку для связывания

полипептидов, за счет чего практически все высвобожденные гликаны перемещаются из колонки для связывания полипептидов; (d) перемещения высвобожденных гликанов в направлении реакционного змеевика; (e) перемещения реагента для мечения гликанов в направлении высвобожденных гликанов перед их попаданием в реакционный змеевик, так что реагент для мечения гликанов смешивается с высвобожденными гликанами; (f) перемещения смеси высвобожденных гликанов и реагента для мечения гликанов в реакционный змеевик, в результате чего происходит мечение гликанов в смеси; (g) перемещения смеси в охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционного змеевика, при этом охлаждающий змеевик снижает температуру смеси; (h) перемещения смеси в колонку для связывания гликанов, в результате чего меченые гликаны связываются с колонкой для связывания гликанов; (i) установки многопортового клапана во второе положение, при котором колонка для связывания гликанов соединена по текучей среде с источником раствора элюирующего буфера через второй порт многопортового клапана; и, (j) когда многопортовый клапан находится во втором положении, перемещения раствора элюирующего буфера из источника раствора элюирующего буфера в колонку для связывания гликанов и сквозь колонку для связывания гликанов, за счет чего элюируются гликаны, связанные с колонкой для связывания гликанов.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой блок-схему поточной системы для выполнения анализа гликанов в режиме реального времени, собранной в соответствии с идеями настоящего изобретения.

Фиг. 2 представляет собой блок-схему контроллера из системы, проиллюстрированной на фиг. 1.

Фиг. 3А и 3В представляют собой графики, изображающие результаты исследования по отслеживанию эффективности системы, изображенной на фиг. 1, на протяжении производственного цикла продолжительностью 32 дня.

Фиг. 3С представляет собой график, изображающий краткое описание результатов, изображенных на фиг. 3А, за период времени четыре дня.

Фиг. 3D и 3Е представляют собой дополнительные графики, изображающие результаты исследования.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

На фиг. 1 проиллюстрирована блок-схема системы 100, собранной в соответствии с идеями настоящего изобретения. Система 100, которая может помещаться в лаборатории (например, лаборатории по контролю готовой продукции высокомолекулярных соединений), представляет собой закрытую систему для автоматической или практически автоматической подготовки образца продукта, содержащего полипептиды, для анализа гликанов и автоматического выполнения анализа гликанов в таком образце, как более подробно описано ниже. Путем автоматизации (или практически полной автоматизации) данного способа с применением системы 100 анализ можно выполнять в режиме реального времени (или практически реального времени), так что весь способ можно выполнить и получить требуемый результат за считанные часы (например, за 2-3 ч), что является значительным улучшением в сравнении с 5 днями, которые, как правило, требуются при общеизвестных, проводимых вручную способах. Более того, закрытая природа данного способа, в котором используется система 100, поддерживает стерильные условия.

В данном варианте полипептиды представляют собой терапевтические полипептиды. Терапевтические полипептиды обсуждаются ниже.

Система 100, проиллюстрированная на фиг. 1, в целом включает многопортовый клапан 104, удерживающий змеевик 108, первую колонку 112, реакционный змеевик 120, вторую колонку 124 и контроллер 132. В варианте, проиллюстрированном на фиг. 1, система 100 также включает резервуар 136, камеру 138 для отходов, первый насос 140, источник 142 ферментов, первый источник 144 буфера, второй насос 146, второй источник 148 буфера, вакуум-аппарат 150, охлаждающий змеевик 152, третий источник 154 буфера, четвертый источник 156 буфера, смесительную камеру 157 и аналитическое устройство 158 для анализа гликанов. Однако в других вариантах система 100 может не включать один или несколько из данных компонентов. В качестве примера, система 100 может не включать резервуар 136, вакуум-аппарат 150, охлаждающий змеевик 152 и/или аналитическое устройство 158. В любом случае, при необходимости, обычно между каждым из компонентов системы 100 проходит традиционная система трубопроводов, чтобы содействовать соединению по текучей среде между компонентами системы 100, как более подробно описано ниже.

Многопортовый клапан 104 обычно выполнен с возможностью управления соединением по текучей среде между различными компонентами системы 100. В данном варианте многопортовый клапан 104 представляет собой клапан с двенадцатью периферическими портами и центральным общим портом. Другими словами, многопортовый клапан 104 имеет центральный порт 160 и двенадцать периферических портов 164-175, которые избирательно соединяются по текучей среде с центральным портом 160. Многопортовый клапан 104 может перемещаться между двенадцатью различными положениями, которые по текучей среде соединяют центральный порт 160 с двенадцатью различными периферическими портами 164-175 соответственно (некоторые из которых не используются при работе системы 100, изображенной на фиг. 1). В других вариантах многопортовый клапан 104 может иметь больше или меньше

периферических портов, может представлять собой клапан другого типа или может быть заменен одним или несколькими другими клапанами (каждый из которых имеет один или несколько портов). В качестве примера, многопортовый клапан 104 может быть заменен совокупностью однопортовых клапанов, раздельно соединенных с контроллером 132 и управляемых с его помощью, при этом каждый из однопортовых клапанов эффективно заменяет один из периферических портов 164-175.

Резервуар 136 обычно выполнен с возможностью содержания или хранения продукта, содержащего полипептиды с гликанами, которые необходимо подготовить и проанализировать. Резервуар 136 в данном варианте представлен в виде биореактора, в котором содержится или хранится продукт. Однако в других вариантах резервуар 136 вместо этого может быть представлен в виде резервуара для клеточной культуры, такого как колба, планшет и т. д. Резервуар 136 соединен по текучей среде с периферическим портом 164 клапана 104 через канал 180 системы трубопроводов, так что при необходимости клапан 104 может получать образец продукта, содержащегося в резервуаре 136, из резервуара 136.

Удерживающий змеевик 108 помещен до клапана 104 и соединен по текучей среде с центральным портом 160 клапана 104 через канал 184 системы трубопроводов. Удерживающий змеевик 108 смонтирован таким образом, чтобы получать образец продукта из резервуара 136 через клапан 104, когда клапан 104 находится в первом положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 164.

Первый насос 140 помещен до удерживающего змеевика 108 и соединен с ним по текучей среде через канал 188 системы трубопроводов. В данном варианте насос 140 представлен в виде поршневого насоса, который обычно выполнен с возможностью облегчения получения различных материалов и облегчает перемещение этих материалов к различным компонентам и между ними в системе 100, как более подробно описано ниже. В других вариантах насос 140 может быть насосом другого типа, и/или несколько насосов 140 может применяться для различных материалов и/или для вывода материалов в другие компоненты.

Клапан 192 помещен между первым насосом 140 и удерживающим змеевиком 108 для избирательного соединения по текучей среде первого насоса 140 с удерживающим змеевиком 108. Более конкретно, клапан 192 может перемещаться между первым положением, при котором насос 140 соединен по текучей среде с удерживающим змеевиком 108, и вторым положением, при котором насос 140 изолирован по текучей среде от удерживающего змеевика 108. Другими словами, насос 140 избирательно соединяется по текучей среде с удерживающим змеевиком 108, в зависимости от положения клапана 192.

При необходимости и когда клапан 104 находится в первом положении (при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 164), а клапан 192 находится в первом положении, первый насос 140 может содействовать перемещению образца продукта из резервуара 136 в удерживающий змеевик 108 через клапан 104. Образец продукта, в свою очередь, может переходить в первую колонку 112 для связывания.

Первая колонка 112 помещена после клапана 104 и имеет вход, соединенный по текучей среде с периферическим портом 165 клапана 104 через канал 196 системы трубопроводов. Таким образом, когда клапан 104 находится во втором положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 165, первый насос 140 может облегчать перемещение (например, прокачивать, обеспечивать переход) образца продукта из удерживающего змеевика 108 в первую колонку 112 через клапан 104. Первая колонка 112 имеет выход, который соединен по текучей среде с трехходовым клапаном 198, выполненным с возможностью избирательно соединять по текучей среде первую колонку 112 либо с камерой 138 для отходов, либо с реакционным змеевиком 120. Более конкретно, трехходовой клапан 198 может перемещаться между первым положением, при котором первая колонка 112 соединена по текучей среде с камерой 138 для отходов и изолирована по текучей среде от вакуум-аппарата 150, и вторым положением, при котором первая колонка 112 соединена по текучей среде с вакуум-аппаратом 150 и изолирована по текучей среде от камеры 138 для отходов. В данном варианте первое положение трехходового клапана 198 является положением по умолчанию, так что трехходовой клапан 198 перемещается из первого положения во второе только в ответ на приведение в действие трехходового клапана 198 (например, под управлением контроллера 132, путем подачи тока на клапан 198). Однако в других вариантах положением по умолчанию может быть второе положение трехходового клапана 198. В любом случае, когда первая колонка 112 получает образец, первая колонка 112 может связывать практически все полипептиды из образца по мере перетекания образца сквозь нее, а трехходовой клапан 198 находится в своем первом положении. Таким образом, первая колонка 112 практически полностью отделяет полипептиды в образце от оставшейся части образца, которая может переходить в камеру 138 для отходов через трехходовой клапан 198.

Первая колонка 112, которая в данном документе также может обозначаться как колонка для связывания полипептидов, выбрана из группы, состоящей из колонки с белком А, колонки с белком G, колонки с белком А/G, колонки с белком L, колонки для разделения аминокислот, колонки с авидином, колонки со стрептавидином, колонки для связывания углеводов, колонки для разделения углеводов, колонки с глутатионом, колонки с гепарином, колонки для гидрофобных взаимодействий, иммуноаффинной колонки, колонки для разделения нуклеотидов/коферментов, специализированной колонки и колонки для

аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (IMAC). Например, в случае полипептидов, которые представляют собой человеческие IgG подклассов 1, 2 или 4, IgM, IgA или IgE (и содержащие человеческую Fc-часть и/или Fab-область семейства VH3 человека), пригодны колонки с белком А. Для очистки человеческих IgG подклассов 1-4 можно применять белок G. Для очистки всех данных классов человеческих антител также можно применять рекомбинантный слитый белок A/G, поскольку в слитом белке обеспечены сайты связывания белка А и белка G. Таким образом, для очистки человеческих IgG, IgA, IgE и IgM можно применять слитые белки на основе белка A/G. Более того, для очистки человеческих IgG, IgM, IgA, IgE и IgD можно применять белок L, при условии, что целевые антитела имеют соответствующую легкую цепь подтипа каппа (κ) (т.е. подтипов V κ I, V κ III и V κ IV); белок L также можно применять для очистки Fab- и scFv-фрагментов, также имеющих соответствующую цепь подтипа κ , поскольку белок L связывает цепь варибельной области (V) антител.

После того как практически все полипептиды из образца свяжутся с первой колонкой 112, раствор, содержащий глюканызы (например, состоящий из них), подается в систему 100 за счет источника 142 ферментов, который соединен по текучей среде с периферическим портом 166 клапана 104 через канал 200 системы трубопроводов. В данном варианте раствор, содержащий глюканызы, перемещается в удерживающий змеевик 108 через клапан 104 и при помощи насоса 140, когда клапан 104 находится в третьем положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 166, и когда клапан 192 находится в первом положении. В свою очередь раствор, содержащий глюканызы, перемещается из удерживающего змеевика 108 в первую колонку 112 через клапан 104 и, опять же, при помощи насоса 140, когда клапан 104 находится во втором положении (при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 165), и когда клапан 192 находится в первом положении. Однако в других вариантах раствор, содержащий глюканызы, может подаваться в первую колонку 112 иным способом (например, непосредственно в первую колонку 112 без помощи насоса 140). В любом случае, когда раствор, содержащий глюканызы, попадает в первую колонку 112, глюканызы в растворе проникают в полипептиды, связанные на первой колонке 112. Проникновению обычно содействует инкубирование первой колонки 112, которое в данном варианте осуществляют путем поддержания первой колонки 112 при температуре от приблизительно 35 до приблизительно 40°C и более предпочтительно температуре, составляющей приблизительно 37°C. Для этого к первой колонке 112 можно присоединить нагревательный элемент (например, нагревательный змеевик, индукционный нагреватель, тепловой насос, патронный нагреватель) для подвода тепла, необходимого для поддержания первой колонки 112 при требуемой температуре. В любом случае понятно, что проникновение глюканыз, содержащихся в растворе, служит для высвобождения гликанов в связанных полипептидах из связанных полипептидов в раствор.

Глюканызы в растворе предпочтительно выбраны из группы, состоящей из эндогликозидаз, гликозамидаз и O-гликаныз и их комбинаций. Когда глюканызы представляют собой или включают эндогликозидазы, тогда эндогликозидазы предпочтительно выбраны из группы, состоящей из эндогликозидазы D, эндогликозидазы F (эндогликозидазы F1, эндогликозидазы F2 и эндогликозидазы F3 и их комбинаций), эндогликозидазы H, эндогликозидазы S, эндогликозидазы M и эндогликозидазы B. Когда глюканызы представляют собой или включают гликозамидазы, тогда гликозамидазы предпочтительно выбраны из группы, состоящей из гликопептидаз, пептид-N-гликозидаз, PNG-аз, N-гликогидролаз и N-гликаныз. Когда глюканызы представляют собой или включают PNG-азы, тогда PNG-азы предпочтительно включают пептид:N-гликозидазу F (PNGF). Когда глюканызы представляют собой или включают O-гликанызы, тогда O-гликанызы предпочтительно представляют собой эндо-GalNAc-азу D или эндо-GalNAc-азу A.

После высвобождения (или практически полного высвобождения) гликанов в связанных полипептидах в раствор и при нахождении трехходового клапана 198 в его втором положении (или перемещении в его второе положение) раствор-носитель (например, деионизированную (DI) воду) перемещают в первую колонку 112 и сквозь нее, чтобы переместить высвобожденные гликаны (в растворе с глюканызами) из первой колонки 112. Раствор-носитель обычно подается в систему 100 за счет первого источника 144 буфера, который соединен по текучей среде с периферическим портом 167 клапана 104 через канал 204 системы трубопроводов. В данном варианте раствор-носитель перемещается в удерживающий змеевик 108 через клапан 104 и при помощи насоса 140, когда клапан 104 находится в четвертом положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 167, и когда клапан 192 находится в первом положении. В свою очередь раствор-носитель перемещается из удерживающего змеевика 108 в первую колонку 112 и сквозь нее через клапан 104 и, опять же, при помощи насоса 140, когда клапан 104 находится во втором положении (при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 165), и когда клапан 192 находится в первом положении. Однако в других вариантах раствор-носитель может подаваться в первую колонку 112 иным способом (например, непосредственно в первую колонку 112 и/или без помощи насоса 140). В любом случае понятно, что раствор-носитель переносит или перемещает высвобожденные гликаны (и глюканызы) сквозь первую колонку 112 и из нее.

Второй насос 146 помещен после первой колонки 112. Подобно первому насосу 140 второй насос 146 в данном варианте представлен в виде поршневого насоса, который обычно выполнен с возможно-

стью облегчения получения различных материалов и облегчает перемещение этих материалов к различным компонентам и между ними в системе 100, как более подробно описано ниже. В других вариантах насос 146 может быть насосом другого типа, и/или несколько насосов 146 может применяться для различных материалов и/или для вывода материалов в другие компоненты.

Клапан 208 помещен между вторым насосом 146 и каналом 212 системы трубопроводов, помещенным после первой колонки 112, для избирательного соединения по текучей среде второго насоса 146 с каналом 212 после первой колонки 112. Более конкретно, клапан 208 может перемещаться между первым положением, при котором насос 140 соединен по текучей среде с удерживающим змеевиком 108, и вторым положением, при котором насос 140 изолирован по текучей среде от удерживающего змеевика 108. Другими словами, насос 140 избирательно соединяется по текучей среде с удерживающим змеевиком 108, в зависимости от положения клапана 192.

Второй насос 146 в данном варианте также соединен по текучей среде со вторым источником 148 буфера, который выполнен с возможностью подавать реагент для мечения гликанов, такой как, например, флуорофор (например, выбранный из группы, состоящей из 2-аминобензойной кислоты, динатриевой соли 8-аминонафталин-1,3,6-трисульфоновой кислоты, тринатриевой соли 8-аминонафталин-1,3,6-трисульфоновой кислоты и антрамиламида, 4-метоксибензамидина) или хромофор (например, 3-метил-1-фенил-2-пиразолин-5-он или фенилгидразин). Таким образом, когда клапан 208 находится в первом положении, второй насос 146 может перемещать (например, прокачивать, направлять) реагент для мечения гликанов сквозь канал 212 и в направлении высвобожденных гликанов, переносимых из первой колонки 112 через канал 216 системы трубопроводов. Таким образом, реагент для мечения гликанов смешивается с высвобожденными гликанами в положении после первой колонки 112.

Вакуум-аппарат 150 помещен после как первой колонки 112, так и второго насоса 146. Вакуум-аппарат 150 соединен по текучей среде как с каналом 216 (по которому переносятся высвобожденные гликаны из первой колонки 112), так и с каналом 212 (по которому переносится гликановый реагент из второго насоса 146) через канал 220 системы трубопроводов. Следовательно, вакуум-аппарат 150 смонтирован для приема смеси высвобожденных гликанов и гликанового реагента. По мере того, как смесь перетекает сквозь вакуум-аппарат 150, вакуум-аппарат 150 удаляет пузырьки газа (например, воздуха) из смеси (т.е. обеспечивает дегазацию смеси), которые, как известно из уровня техники, могут препятствовать эффективной работе нижерасположенных компонентов системы 100 (например, препятствуя доставке по градиенту концентрации).

Реакционный змеевик 120 помещен после вакуум-аппарата 150 (и, таким образом, также после первой колонки 112 и второго насоса 146). Вход 224 реакционного змеевика 120 соединен по текучей среде с выходом 228 вакуум-аппарата 150 через канал 230 системы трубопроводов, так что реакционный змеевик 120 смонтирован для приема смеси, содержащей реагент для мечения гликанов и высвобожденные гликаны. Реакционный змеевик 120, в свою очередь, обычно выполнен с возможностью содействия мечению (например, флуоресцентному мечению) высвобожденных гликанов. Оно обычно осуществляется за счет инкубирования смеси в реакционном змеевике 120. Для этого реакционный змеевик 120 в данном варианте нагревают за счет нагревательного элемента 232, соединенного (например, установленного непосредственно вблизи, окружающего) с реакционным змеевиком 120. Другими словами, нагревательный элемент 232 может подводить тепло, предпочтительно тепло, имеющее температуру от приблизительно 75 до приблизительно 85°C и более предпочтительно тепло, имеющее температуру приблизительно 80°C, к реакционному змеевику 120, стимулируя мечение. Нагревательный элемент 232 может быть представлен в виде, например, нагревательного змеевика, индукционного нагревателя, теплового насоса, патронного нагревателя, провода электрического сопротивления или другого элемента, подходящего для нагревания одной или нескольких частей реакционного змеевика 120.

Охлаждающий змеевик 152, который в данном варианте выполнен из нержавеющей стали, помещен после реакционного змеевика 120 и соединен с ним по текучей среде. Более конкретно, вход 234 охлаждающего змеевика 152 соединен по текучей среде с выходом 238 реакционного змеевика 120 через канал 242 системы трубопроводов, так что охлаждающий змеевик 152 смонтирован для приема смеси, содержащей реагент для мечения гликанов и высвобожденные (и теперь помеченные) гликаны. Охлаждающий змеевик 152 поддерживается (например, под управлением контроллера 132) при температуре, которая меньше температуры, при которой поддерживается реакционный змеевик 120. Таким образом, охлаждающий змеевик 152 не только снижает температуру смеси, но также растягивает смесь по мере ее перетекания сквозь него, за счет чего содержание органических веществ в смеси снижается. Тем самым реакционный змеевик 120 увеличивает способность гликанов связываться со второй колонкой.

Вторая колонка 124, также называемая в данном документе колонкой 124 для связывания гликанов, предпочтительно представлена в виде колонки с пористым графитизированным углеродом, которая помещена после охлаждающего змеевика 152 и соединена с ним по текучей среде через канал 246. Вторая колонка 124 смонтирована таким образом, чтобы принимать охлажденную и разведенную смесь из охлаждающего змеевика 152. Для содействия перемещению охлажденной и разведенной смеси из охлаждающего змеевика 152 во вторую колонку 124 второй насос 146, когда клапан 208 находится в первом положении, может перемещать буферный раствор (например, полученный из ацетонитрила (5%) с 0,1%

раствором TFA) из третьего источника 154 буфера, который по текучей среде соединен с ним, во вторую колонку 124 через каналы 212, 220, 230, 234 и 246. В любом случае, когда вторая колонка 124 принимает смесь из охлаждающего змеевика 152, вторая колонка 124 может связывать меченые гликаны из смеси по мере перетекания смеси сквозь нее. Таким образом, вторая колонка 124 отделяет меченые гликаны в смеси от оставшейся части смеси, которая может переходить в отходы (не показано).

Вторая колонка 124 также соединена по текучей среде с периферическим портом 169 клапана 104 через канал 250 системы трубопроводов. В данном варианте канал 250 соединяется или пересекает канал 246 до второй колонки 124, но в других вариантах вместо этого канал 250 может миновать канал 246 и непосредственно соединяться со второй колонкой 124. В любом случае, раствор элюирующего буфера (например, полученный из ацетонитрила (5%) с 0,1% раствором TFA) перемещается во вторую колонку 124 и сквозь нее через канал 250, чтобы элюировать практически все связанные и меченые гликаны. Раствор элюирующего буфера обычно подается за счет четвертого источника 156 буфера, который соединен по текучей среде с периферическим портом 168 клапана 104 через канал 254 системы трубопроводов. В данном варианте раствор элюирующего буфера перемещается из четвертого источника 156 буфера в удерживающий змеевик 108 через клапан 104 и при помощи насоса 140, когда клапан 104 находится в пятом положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 168, и когда клапан 192 находится в первом положении. В свою очередь раствор элюирующего буфера перемещается из удерживающего змеевика 108 во вторую колонку 124 и сквозь нее через клапан 104 и, опять же, при помощи насоса 140, когда клапан 104 находится в шестом положении, при котором центральный порт 160 соединен по текучей среде с периферическим портом 169, и когда клапан 192 находится в первом положении. Однако в других вариантах раствор элюирующего буфера может подаваться во вторую колонку 124 иным способом (например, непосредственно во вторую колонку 124 и/или без помощи насоса 140). В любом случае, подаваемый раствор элюирующего буфера практически полностью элюирует гликаны, связанные со второй колонкой 124, и переносит или перемещает эти элюированные гликаны сквозь вторую колонку 124 и из нее.

В данном варианте раствор элюирующего буфера переносит гликаны из второй колонки 124 в смесительную камеру 157, которая помещена после второй колонки 124 и соединена по текучей среде с ней через канал 258 системы трубопроводов. Смесь раствора элюирующего буфера и гликанов перетекает сквозь смесительную камеру 157, которая помогает снизить содержание органических веществ в смеси и служит для корректировки компонента элюирующего буфера с гликанами, чтобы он соответствовал начальному состоянию хроматографической подвижной фазы. Другими словами, смесительная камера 157 помогает обеспечить то, чтобы смесь характеризовала исходный образец, полученный из резервуара 136.

После того как смесь находилась в смесительной камере 157 в течение заранее заданного времени, смесь может перемещаться, например, с применением раствора элюирующего буфера в аналитическое устройство 158, которое, например, может быть представлено в виде устройства для жидкостной хроматографии, устройства для высокоэффективной жидкостной хроматографии, устройства для сверхэффективной жидкостной хроматографии, устройства для масс-спектрометрии, устройства для анализа гликанов, устройства для другого анализа или их комбинации. В данном варианте аналитическое устройство 158 помещено после второй колонки 124 и соединено по текучей среде со второй колонкой 124 через канал 262 системы трубопроводов. Так, в данном варианте смесь может автоматически перемещаться в аналитическое устройство 158 для анализа гликанов (например, для количественной оценки и разделения гликанов в смеси). Однако в других вариантах аналитическое устройство 158 может не быть частью системы 100 (например, не соединяться по текучей среде с третьей колонкой 128), в таком случае смесь может быть перемещена в аналитическое устройство 158 иным способом (например, вручную).

Как вкратце отмечалось выше, система 100 также включает контроллер 132, который в данном варианте связан коммуникационным взаимодействием или соединен с различными компонентами системы 100, чтобы отслеживать и содействовать или направлять вышеописанную работу системы 100 путем передачи сигналов (например, сигналов управления, данных) к различным компонентами системы 100 и получения сигналов (например, данных) от них. Контроллер 132 может быть помещен непосредственно рядом с другими компонентами системы 100 (например, в том же окружении, что и система 100) или может быть помещен удаленно от других компонентов системы 100. Как проиллюстрировано, контроллер 132 связан коммуникационным взаимодействием или соединен с многопортовым клапаном 104 через коммуникационную сеть 300, первым и вторым насосами 140, 146 через коммуникационные сети 320, 324 соответственно, аналитическим устройством 158 через коммуникационную сеть 336, клапанами 192, 208 через коммуникационные сети 340, 344 соответственно и нагревательным элементом 232 через коммуникационную сеть 348. В других вариантах контроллер 132 может быть связан коммуникационным взаимодействием или соединен с большим или меньшим количеством компонентов системы 100, например, удерживающим змеевиком 108, первой колонкой 112, реакционным змеевиком 120, второй колонкой 124, резервуаром 136, охлаждающим змеевиком 152, смесительной камерой 157 и/или трехходовым клапаном 198.

Применяемые в данном документе фразы "связанный коммуникационным взаимодействием" и "соединенный" по определению обозначают непосредственно связанный или соединенный или опосредованно связанный или соединенный через один или несколько промежуточных компонентов. Такие про-

межуточные компоненты могут включать аппаратные и/или программные компоненты. Понятно, что сети 300-348 могут представлять собой беспроводные сети, проводные сети или комбинации проводной и беспроводной сети (например, сотовой телефонной сети и/или сети стандарта 802.11x) и могут включать общедоступную сеть, такую как Интернет, частную сеть или их комбинацию. Тип и конфигурация сетей 300-348 зависят от способа реализации, и можно применять сети с коммуникацией любого типа, которые содействуют описанной коммуникации между контроллером 132 и компонентами системы 100, доступные на данный момент или те, которые будут разработаны позже.

Как показано на фиг. 2, контроллер 132 включает процессор 352, запоминающее устройство 356, коммуникационный интерфейс 360 и вычислительный алгоритм 364. Процессор 352 может представлять собой универсальный процессор, процессор для цифровой обработки сигналов, ASIC, логическую матрицу, программируемую пользователем, графический процессор, аналоговый контур, цифровой контур или любой другой известный процессор или процессор, который будет разработан позже. Процессор 352 работает в соответствии с инструкциями, находящимися в запоминающем устройстве 356. Запоминающее устройство 356 может представлять собой энергозависимое или энергонезависимое запоминающее устройство. Запоминающее устройство 356 может включать одно или несколько из постоянного запоминающего устройства (ROM), запоминающего устройства с произвольной выборкой (RAM), флэш-памяти, электронно-перепрограммируемого постоянного запоминающего устройства (EEPROM) или другого типа запоминающего устройства. Запоминающее устройство 356 может включать оптическую, магнитную (жесткий диск) или любую другую форму устройства хранения данных.

Коммуникационный интерфейс 360 предусмотрен для обеспечения возможности или содействия электронной коммуникации между контроллером 132 и компонентами системы 100 охлаждения через сети 300-348. Коммуникационный интерфейс 360 может представлять собой или включать, например, один или несколько портов универсальной последовательной шины (USB), один или несколько портов локальной сети и/или один или несколько других портов или интерфейсов. Электронная коммуникация может происходить с помощью любого известного протокола коммуникации, включая, например, USB, RS-232, RS-485, WiFi, Bluetooth и/или любой другой подходящий протокол коммуникации.

Алгоритм 364 обычно включает одну или несколько стандартных программ управления и/или одну или несколько стандартных подпрограмм, осуществляемых как машиночитаемые инструкции, хранимые в запоминающем устройстве 356. Стандартные программы и/или подпрограммы управления могут выполнять PID (пропорционально-интегрально-дифференциальное) управление, управление с использованием нечеткой логики, нелинейное управление или любой другой подходящий тип управления. Процессор 352 обычно исполняет алгоритм 364 для выполнения действий, связанных с работой системы 100.

В общих чертах, алгоритм 364, при его исполнении, заставляет процессор 352 управлять компонентами системы 100, в частности многопортовым клапаном 104, первым и вторым насосами 140, 146, аналитическим устройством 158, первым и вторым клапанами 192, 208 и нагревательным элементом 232, так что система 100 работает требуемым образом, обсуждаемым в данном документе. Более конкретно, алгоритм 364, при его исполнении, может заставлять процессор 352: (i) перемещать многопортовый клапан 104 в любое положение, описанное в данном документе, или между такими положениями, за счет чего различные компоненты системы 100 соединяются по текущей среде, как описано выше, (ii) управлять первым насосом 140 (например, заставлять насос 140 получать или направлять материалы, как описано выше), (iii) управлять вторым насосом 146 (например, заставлять насос 146 получать или направлять материалы, как описано выше), (iv) открывать или закрывать клапан 192, (v) открывать или закрывать клапан 208, (vi) управлять нагревательным элементом 232 (при его использовании) для управления температурой реакционного змеевика 120 за счет избирательного подвода тепла к реакционному змеевику 120 и (vii) управлять аналитическим устройством 158.

В других вариантах алгоритм 364, при его исполнении процессором 352, может заставлять выполнять дополнительные функции, меньшее число функций и/или иные функции. В качестве примера, алгоритм 364, при его исполнении процессором 352, может не перемещать гликаны из второй колонки 124 в аналитическое устройство 158 или не заставлять аналитическое устройство 156 выполнять требуемый анализ. Более того, в других вариантах алгоритм 364 может исполняться процессором 352 в ином порядке, чем описанный в данном документе. Наконец, понятно, что алгоритм 364 может исполняться процессором 352 любое число отдельных раз, поскольку систему 100 можно применять для выполнения анализов нескольких образцов (от одного и того же продукта и/или от другого продукта) в режиме реального времени.

На фиг. 3А-3Е проиллюстрированы результаты поточного исследования профиля гликозилирования в режиме реального времени для отслеживания эффективности системы 100 при подготовке образца терапевтического полипептида на основе антитела. В частности, в ходе исследования отслеживали эффективность системы 100 на протяжении производственного цикла продолжительностью 32 дня. Отслеживание и сбор данных CQA, таких как %A1G0F, %A2G0F, %A2G1F (гликаны) и %M5 (манноза 5) в исследовании начинали на четвертый день 32-дневного производственного цикла. Как проиллюстрировано на фиг. 3А и 3В, система 100 была способна и эффективно выполняла заданные функции, обсуждаемые в данном документе, на всем протяжении 32-дневного производственного цикла, и, как проиллюстрирова-

но на фиг. 3D и 3E, данные CQA, собранные в период от дня четыре до дня 32 были стабильными, т.е. отсутствовало изменение качества продукта с течением времени, за счет чего демонстрируется эффективность и надежность системы 100. Это происходило несмотря на тот факт, что на день 20 производственного цикла поток газообразного кислорода в резервуар 136 был прерван на два часа вследствие утечки в кислородном баллоне. В свою очередь, частоту забора образцов из резервуара 136 увеличивали (в данном случае от забора через 24 часа до забора через шесть часов), чтобы отслеживать резервуар 136 с более высоким разрешением и оценить риск продолжения производственного цикла. Тем не менее, как продемонстрировано на фиг. 3A-3C, это прерывание оказывало лишь временное влияние на некоторые данные CQA, и данные CQA быстро вернулись к значениям до прерывания и стабилизировались. Соответственно, было принято решение продолжить производственный цикл.

Терапевтические полипептиды.

В раскрытых устройствах и способах могут быть применимы белки, включая те, которые связываются с одним или несколькими из нижеуказанного. Они включают белки CD, включая CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22, CD30 и CD34; включая белки, которые препятствуют связыванию с рецептором. Белки семейства рецепторов HER, в том числе HER2, HER3 и HER4, и рецептор EGF. Молекулы клеточной адгезии, например, LFA-1, MoI, p150, 95, VLA-4, ICAM-1, VCAM и альфа-v/бета-3 интегрин. Факторы роста, такие как фактор роста эндотелия сосудов ("VEGF"), гормон роста, тиреотропный гормон, фолликулостимулирующий гормон, лютеинизирующий гормон, фактор высвобождения гормона роста, паратиреоидный гормон, мюллерова ингибирующая субстанция, воспалительный белок макрофагов человека (MIP-1-альфа), эритропоэтин (EPO), фактор роста нервной ткани, такой как NGF-бета, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), факторы роста фибробластов, включая, например, aFGF и bFGF, эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующие факторы роста (TGF), включая, среди прочего, TGF- α и TGF- β , включая TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 или TGF- β 5, инсулиноподобные факторы роста-I и -II (IGF-I и IGF-II), дез(1-3)-IGF-1 (IGF-I головного мозга) и остеоиндуктивные факторы. Инсулины и родственные инсулину белки, включая инсулин, А-цепь инсулина, В-цепь инсулина, проинсулин и белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста. Белки, задействованные в процессах коагуляции и связанные с коагуляцией, такие как, среди прочего, фактор VIII, тканевой фактор, фактор фон Виллебранда, белок С, альфа-1-антитрипсин, активаторы плазминогена, такие как урокиназа и тканевой активатор плазминогена ("t-PA"), бомбесин, тромбин и тромбопоэтин; (vii) другие белки крови и сыворотки, включая без ограничения альбумин, IgE и антигены группы крови. Колонистимулирующие факторы и их рецепторы, включая, среди прочего, M-CSF, GM-CSF и G-CSF и их рецепторы, такие как рецептор CSF-1 (c-fms). Рецепторы и ассоциированные с рецепторами белки, включая, например, рецептор flk2/flt3, рецептор ожирения (OB), рецептор LDL, рецепторы гормонов роста, рецепторы тромбопоэтина ("TPO-R", "c-mpl"), рецепторы глюкогона, рецепторы интерлейкинов, рецепторы интерферонов, Т-клеточные рецепторы, рецепторы факторов стволовых клеток, такие как c-Kit, и другие рецепторы. Лиганды рецепторов, включая, например, OX40L, лиганд рецептора OX40. Нейротрофические факторы, включая нейротрофический фактор кости (BDNF) и нейротрофин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT-6). А-цепь релаксина; В-цепь релаксина; прорелаксин; интерфероны и рецепторы интерферона, включая, например, интерферон- α , - β и - γ и их рецепторы. Интерлейкины и рецепторы интерлейкинов, включая IL-1 - IL-33 и рецепторы IL-1 - IL-33, такие как, среди прочего, рецептор IL-8. Вирусные антигены, включая антиген оболочки вируса, вызывающего СПИД. Липопроотеины, кальцитонин, глюкогон, предсердный натрийуретический фактор; сурфактант легкого, фактор некроза опухоли-альфа и -бета, энкефалиназа, RANTES (регулируемый при активации, экспрессируемый и секретлируемый нормальными Т-клетками), мышинный гонадотропин-связанный пептид, ДНКаза, ингибин и активин. Интегрин, белок А или D, ревматоидные факторы; иммуноксины, костный морфогенетический белок (BMP), супероксид-дисмутаза, поверхностные мембранные белки, фактор ускорения распада (DAF), оболочка вируса, вызывающего СПИД, транспортные белки, хоминг-рецепторы, адрессины, регуляторные белки, иммуноадгезины, антитела. Миостатины, белки TALL, включая TALL-1, амилоидные белки, включая без ограничения белки бета-амилоида, тимусные стромальные лимфопоэтины ("TSLP"), лиганд RANK ("OPGL"), c-kit, рецепторы TNF, включая рецептор TNF типа 1, TRAIL-R2, ангиопоэтины и биологически активные фрагменты или аналоги или варианты любого из вышеуказанного.

Иллюстративные полипептиды и антитела включают Activase® (альтеплаза); алирокумаб, Aranesp® (дарбапоэтин-альфа), Erogen® (эпоэтин-альфа или эритропоэтин); Avonex® (интерферон β -1a); Bexxar® (тозитумомаб); Betaseron® (интерферон- β); бокоцизумаб (моноклональное антитело к PCSK9, обозначенное как L1L3, см. US8080243); Campath® (алемтузумаб); Дунеро® (эпоэтин-дельта); Velcade® (бортезомиб); MLN0002 (mAb к $\alpha\beta$ 7); MLN1202 (mAb к рецептору хемокина CCR2); Enbrel® (этанерцепт); Eprex® (эпоэтин-альфа); Erbitux® (цетуксимаб); эволокумаб; Genotropin® (соматропин); Herceptin® (трастузумаб); Humatrop® (соматропин [источник получения рДНК] для инъекции); Humira® (адалимумаб); Infergen® (интерферон альфакон-1); Natrecor® (несиритид); Kineret® (анакинра), Leukine® (саргамостим); LymphoCide® (эпратузумаб); Benlysta™ (белимумаб); Metalyse® (тенектеплаза); Mircera® (метоксиполиэтиленгликоль-эпоэтин-бета); Mylotarg® (гемтузумаб озогамидин); Raptiva® (эфализумаб);

Cimzia® (цертализумаб пегол); Soliris™ (экулизумаб); пекселизумаб (антитело к C5-компоненту системы комплемента); MEDI-524 (Numax®); Lucentis® (ранибизумаб); эдреколомаб (Panogex®); Trabio® (лерделимумаб); терацим hR3 (нимотузумаб); омнитарг (пертузумаб, 2C4); Osidem® (IDM-I); OvaRex® (B43.13); Nuvion® (висилизумаб); кантузумаб мертанзин (huC242-DM1); NeoRecormon® (эпоэтин-бета); Neumega® (опрелвекин); Neulasta® (пегилированный филгастрим, пегилированный G-CSF, пегилированный hu-Met-G-CSF); Neupogen® (филгастрим); ортоклон ОКТ3® (муромонаб-CD3), Procrit® (эпоэтин-альфа); Remicade® (инфликсимаб), Reopro® (абциксимаб), Actemra® (mAb к рецептору IL6), Avastin® (бевацизумаб), HuMax-CD4 (занолимумаб), Rituxan® (ритуксимаб); Tarceva® (эрлотиниб); Roferon-A® (интерферон альфа-2а); Simulect® (базиликсимаб); Stelara™ (устекинумаб); Prexige® (лумиракоксиб); Synagis® (паливизумаб); 146B7-CHO (антитело к IL5, см. US7153507), Tysabri® (натализумаб); Valortim® (MDX-1303, mAb к защитному антигену B. anthracis); ABthrax™; Vectibix® (панитумумаб); Xolair® (омализумаб), ETI211 (mAb к MRSA), ловушку для IL-1 (Fc-часть человеческого IgG1 и внеклеточные домены обоих компонентов рецептора IL-1 (рецептора I типа и акцессорного белка)), ловушку для VEGF (Ig-домены VEGFR1, слитые с Fc IgG1), Zenarax® (даклизумаб); Zenaraxc® (даклизумаб), Zevalin® (ибритумомаб тиуксетан), зетию (эзетимиб), атацицепт (TACI-Ig), mAb к $\alpha\beta 7$ (ведолизумаб); галиксимаб (моноклональное антитело к CD80), mAb к CD23 (люмиксимаб); BR2-Fc (слитый белок huBR3/huFc, растворимый антагонист BAFF); Simponi™ (голимумаб); мапатумумаб (человеческое mAb к рецептору TRAIL-1); окрелизумаб (человеческое mAb к CD20); HuMax-EGFR (залутумумаб); M200 (волоциксимаб, mAb к интегрину $\alpha 5\beta 1$); MDX-010 (ипилимумаб, mAb к CTLA-4 и VEGFR-I (IMC-18F1); mAb к BR3; mAb к токсину А и токсину В C. difficile (MDX-066 (CDA-I) и MDX-1388); конъюгаты PE38-dsFv к CD22 (CAT-3888 и CAT-8015); mAb к CD25 (HuMax-TAC); антитела к TSLP; антитело к рецептору TSLP (US8101182); антитело к TSLP, обозначенное как A5 (US7982016); (mAb к CD3 (NI-0401); адекатумумаб (MT201, mAb к EpCAM-CD326); MDX-060, SGN-30, SGN-35 (mAb к CD30); MDX-1333 (антитело к IFNAR); HuMax CD38 (mAb к CD38); mAb к CD40L; mAb к Crip1; антитело к CTGF, вызывающему идиопатический легочный фиброз, которое проходит испытание I фазы (FG-3019) от Fibrogen; mAb к CTLA4; mAb к эотаксину (CAT-213); mAb к FGF8; mAb к ганглиозиду GD2; антитела к склеростину (см. US8715663 или US7592429) антитело к склеростину, обозначенное как Ab-5 (US8715663 или US7592429); mAb к ганглиозиду GM2; человеческое mAb к GDF-8 (MYO-029); mAb к рецептору GM-CSF (CAM-3001); mAb к HepC (HuMax HepC); MEDI-545, MDX-1103 (mAb к IFN α); mAb к IGFIR; mAb к IGF-IR (HuMax-Inflam); mAb к IL12/IL23p40 (бриакинумаб); mAb к IL-23p19 (LY2525623); mAb к IL13 (CAT-354); mAb к IL-17 (AIN457); mAb к IL2Ra (HuMax-TAC); mAb к рецептору IL5; mAb к рецепторам интегринов (MDX-018, CNTO 95); mAb к IP10 язвенного колита (MDX-1100); антитело к LLY; BMS-66513; mAb к рецептору маннозы/hCG β (MDX-1307); конъюгат PE38-dsFv к мезотелину (CAT-5001); mAb к PD1 (MDX-1 106 (ONO-4538)); антитело к PDGFR α (IMC-3G3); mAb к TGF β (GC-1008); человеческое mAb к рецептору-2 TRAIL (HGS-ETR2); mAb к TWEAK; mAb к VEGFR/Flt-1; mAb к ZP3 (HuMax-ZP3) и моноклональное антитело к амилоиду-бета, содержащее последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 6 (US7906625).

Примеры антител, подходящих для способов и фармацевтических составов, включают антитела, показанные в табл. 1. Другие примеры подходящих антител включают инфликсимаб, бевацизумаб, цетуксимаб, ранибизумаб, паливизумаб, абаговомаб, абциксимаб, актоксумаб, адалимумаб, афелимумаб, афутозумаб, алацизумаб, алацизумаб пегол, ald518, алемтузумаб, алирокумаб, альтумумаб, аматуксимаб, анатумумаб мафенатокс, анрукинзумаб, аполизумаб, арцитумумаб, азелизумаб, алтинумаб, атлизумаб, аторолимумаб, тоцилизумаб, бапинеузумаб, базиликсимаб, бавитуксимаб, бектумумаб, белимумаб, бернализумаб, бертилимумаб, безилесомаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, бициромаб, биватузумаб, биватузумаб мертанзин, блинатумомаб, блосозумаб, брентуксимаб ведотин, бриакинумаб, бродалумаб, канакинумаб, кантузумаб мертанзин, кантузумаб мертанзин, каплацизумаб, капромаб пендетид, карлумаб, катумаксумаб, сс49, цеделизумаб, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, цитатузумаб богатокс, циксутумумаб, клазакизумаб, кленоликсимаб, кливатузумаб тетраксетан, конатумумаб, кренезумаб, сг6261, дацетузумаб, даклизумаб, далотузумаб, даратумумаб, демцизумаб, деносумаб, детумумаб, дорлимумаб аритокс, дрозитумаб, дулиготумаб, дупилумаб, экроексимаб, экулизумаб, эдобакомаб, эдреколомаб, эфализумаб, эфунгумаб, элотузумаб, элсилимумаб, энаватузумаб, энлимумаб пегол, энокизумаб, энотикумаб, энситуксимаб, эпитумумаб цитуксетан, эпратузумаб, эренумаб, эрлизумаб, эртумаксумаб, этарацизумаб, этролизумаб, эволокумаб, эксбивирумаб, фанолесомаб, фаралимумаб, фарлетузумаб, фасинумаб, fta05, фелвизумаб, фезакинумаб, фиклатузумаб, фигитумумаб, фланвогумаб, фонтолизумаб, форалумаб, фора-вирумаб, фрезолимумаб, фулранумаб, футуксимаб, галиксимаб, ганитумаб, гангенерумаб, гавилимумаб, гемтузумаб озогамидин, гевокизумаб, гирентуксимаб, глембатумумаб ведотин, голимумаб, гомиликсимаб, gs6624, ибализумаб, ибритумомаб тиуксетан, икрукумаб, иговомаб, имциромаб, имгатузумаб, инклакумаб, индатуксимаб равтанзин, инфликсимаб, интетумумаб, инолимумаб, инотузумаб озогамидин, ипилимумаб, иратумумаб, итолизумаб, иксекизумаб, келиксимаб, лабетузумаб, лебрикизумаб, лемалезомаб, лерделимумаб, лексатумумаб, либивирумаб, лигелизумаб, линтузумаб, лирилумаб, лорвотузумаб

мертанзин, лукатумумаб, лумиликсимаб, мапатумумаб, маслимомаб, маврилимумаб, матузумаб, меполизумаб, метелимумаб, милатузумаб, минретумомаб, митумомаб, могамулизумаб, моролимумаб, мотавизумаб, моксетумомаб пасудотокс, муромонаб-cd3, наколомаб тафенатокс, намилумаб, наптумомаб эстафенатокс, нарнутумаб, натализумаб, небакумаб, нецитумумаб, нерелимомаб, несвакумаб, нимотузумаб, ниволумаб, нофетумомаб мерпентан, окаратузумаб, окрелизумаб, одулимомаб, офатумумаб, оларатумаб, олокизумаб, омализумаб, онартузумаб, опортузумаб монатокс, ореговомаб, ортикумаб, отеликсизумаб, окселумаб, озанезумаб, озорализумаб, пагибаксимаб, паливизумаб, панитумумаб, панобакумаб, парсатузумаб, пасколизумаб, патеклизумаб, патритумаб, пемтумомаб, перакизумаб, пертузумаб, пекселизумаб, пидилизумаб, пинтумомаб, плакулумаб, понезумаб, приликсимаб, притумумаб, PRO 140, квилизумаб, ракотумомаб, радретумаб, рафивирумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, регавирумаб, реслизумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, робатумумаб, роледумаб, ромосозумаб, ронтализумаб, ровелизумаб, руплизумаб, самализумаб, сарилумаб, сатумомаб пендетид, секукинумаб, севирумаб, сибротузумаб, сифалимумаб, силтуксимаб, симтузумаб, сиплизумаб, сирукумаб, соланезумаб, солитомаб, сонепцизумаб, сонтузумаб, стамулумаб, сулесомаб, сувизумаб, табалумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, танезумаб, таплитумомаб паптокс, тефибазумаб, телимомаб аритокс, тенатумомаб, тефибазумаб, тенеликсимаб, теплизумаб, тепротумумаб, тезепелумаб, TGN1412, тремелимумаб, тицилимумаб, тилдракизумаб, тигатузумаб, TNX-650, тоцилизумаб, торализумаб, тозитумомаб, тралокинумаб, трастузумаб, TRBS07, трегализумаб, тукотузумаб целмолейкин, тувирумаб, ублитуксимаб, урелумаб, уртоксазумаб, устекинумаб, вапаликсимаб, вателизумаб, ведолизумаб, велтузумаб, вепалимомаб, весенкумаб, висилизумаб, волоциксимаб, ворсетузумаб мафодотин, вотумумаб, залутумумаб, занолимумаб, затуксимаб, зиралимумаб, золимомаб аритокс.

К антителам также относятся адалимумаб, бевацизумаб, блинатумомаб, цетуксимаб, конатумумаб, деносумаб, экулизумаб, эренумаб, эволокумаб, инфликсимаб, натализумаб, панитумумаб, рилотумумаб, ритуксимаб, ромосозумаб, тезепелумаб и трастузумаб, а также антитела, выбранные из табл. 1.

Мишень (неофициальное название)	Концент рация (мг/мл)	Вязкость (сП)	Тип НС (включая аллотипы)	LC Тип	pI	LC, SEQ ID NO	НС, SEQ ID NO
Амилоид	142,2	5,0	IgG1 (f) (R;EM)	Каппа	9,0	1	2
GMCSF (247)	139,7	5,6	IgG2	Каппа	8,7	3	4
CGRPR	136,6	6,3	IgG2	Лямбда	8,6	5	6
RANKL	152,7	6,6	IgG2	Каппа	8,6	7	8
Склеростин (27H6)	145,0	6,7	IgG2	Каппа	6,6	9	10
IL-1R1	153,9	6,7	IgG2	Каппа	7,4	11	12
Миостатин	141,0	6,8	IgG1 (z) (K;EM)	Каппа	8,7	13	14
B7RP1	137,5	7,7	IgG2	Каппа	7,7	15	16
Амилоид	140,6	8,2	IgG1 (za) (K;DL)	Каппа	8,7	17	18
GMCSF (3.112)	156,0	8,2	IgG2	Каппа	8,8	19	20
CGRP (32H7)	159,5	8,3	IgG2	Каппа	8,7	21	22
CGRP (3B6.2)	161,1	8,4	IgG2	Лямбда	8,6	23	24
PCSK9 (8A3.1)	150,0	9,1	IgG2	Каппа	6,7	25	26
PCSK9 (492)	150,0	9,2	IgG2	Каппа	6,9	27	28

CGRP	155,2	9,6	IgG2	Лямбда	8,8	29	30
Гепцидин	147,1	9,9	IgG2	Лямбда	7,3	31	32
TNFR p55)	157,0	10,0	IgG2	Каппа	8,2	33	34
OX40L	144,5	10,0	IgG2	Каппа	8,7	35	36
HGF	155,8	10,6	IgG2	Каппа	8,1	37	38
GMCSF	162,5	11,0	IgG2	Каппа	8,1	39	40
Глюкагон R	146,0	12,1	IgG2	Каппа	8,4	41	42
GMCSF (4.381)	144,5	12,1	IgG2	Каппа	8,4	43	44
Склеростин (13F3)	155,0	12,1	IgG2	Каппа	7,8	45	46
CD-22	143,7	12,2	IgG1 (f) (R;EM)	Каппа	8,8	47	48
INFgR	154,2	12,2	IgG1 (za) (K;DL)	Каппа	8,8	49	50
Ang2	151,5	12,4	IgG2	Каппа	7,4	51	52
TRAILR2	158,3	12,5	IgG1 (f) (R;EM)	Каппа	8,7	53	54
EGFR	141,7	14,0	IgG2	Каппа	6,8	55	56
IL-4R	145,8	15,2	IgG2	Каппа	8,6	57	58
IL-15	149,0	16,3	IgG1 (f) (R;EM)	Каппа	8,8	59	60
IGF1R	159,2	17,3	IgG1 (za) (K;DL)	Каппа	8,6	61	62
IL-17R	150,9	19,1	IgG2	Каппа	8,6	63	64
Dkk1 (6.37.5)	159,4	19,6	IgG2	Каппа	8,2	65	66
Склеростин	134,8	20,9	IgG2	Каппа	7,4	67	68
TSLP	134,2	21,4	IgG2	Лямбда	7,2	69	70
Dkk1 (11H10)	145,3	22,5	IgG2	Каппа	8,2	71	72
PCSK9	145,2	22,8	IgG2	Лямбда	8,1	73	74
GIPR (2G10.006)	150,0	23,0	IgG1 (z) (K;EM)	Каппа	8,1	75	76
Активин	133,9	29,4	IgG2	Лямбда	7,0	77	78
Склеростин (2B8)	150,0	30,0	IgG2	Лямбда	6,7	79	80
Склеростин	141,4	30,4	IgG2	Каппа	6,8	81	82
c-fms	146,9	32,1	IgG2	Каппа	6,6	83	84
$\alpha\beta 7$	154,9	32,7	IgG2	Каппа	6,5	85	86

* Иллюстративная концентрация, подходящая для введения пациенту;

^HC - тяжелая цепь антитела;

LC - легкая цепь антитела.

Исходя из вышеприведенного описания, следует понимать, что устройства, системы и способы, описанные в данном документе, содействуют автоматической (или практически полностью автоматической) подготовке образца продукта, содержащего полипептиды, для анализа гликанов и автоматическому (или практически полностью автоматическому) выполнению анализа гликанов в таком образце. Таким образом, подготовка и анализ могут выполняться практически в режиме реального времени. Другими словами, весь процесс может выполняться намного быстрее, чем обеспечивается с помощью традиционных процессов в настоящее время..

Следует также понимать, что устройства, системы и способы, описанные в данном документе, позволяют легко отслеживать процесс подготовки образца для анализа гликанов и эффективность анализа гликанов в таком образце с применением системы 100, что, в свою очередь, может уменьшать риск и продлевать производственный цикл продукта. В частности, этот процесс можно отслеживать путем определения, например, с применением контроллера, такого как контроллер 132, и/или вручную оператором системы 100, являются ли условия в системе 100 оптимальными, т.е. удовлетворяют ли они заранее заданному пороговому значению производительности. Как проиллюстрировано на фиг. 3D и 3E, например, значения % гликозилирования для набора молекул гликозилирования (в данном случае % M5, A1G0F, A2G0F, % HM, % Fuc, % Gal, A2G1F и % гибридов) можно получать и сравнивать с полученными ретроспективными значениями для этих молекул гликозилирования, собранными во время качественной оценки способа для определения того, являются ли условия в системе 100 оптимальными, так что производственный цикл может быть инициирован, продолжен или удлинен. Однако, если определено, что условия в системе 100 не являются оптимальными, тогда по меньшей мере один компонент культуры клеток можно корректировать до тех пор, пока не будут достигнуты оптимальные условия в закрытой

системе. Примеры компонентов культуры клеток, которые можно корректировать, включают без ограничения: pH, давление, температуру, поток среды (например, скорость потока среды, скорость подачи среды), состав среды (включая аминокислоты, питательные вещества, сахара, буфер), стратегию снабжения газами (например, смесь кислорода и углекислого газа, скорость подачи газа), перемешивание (например, скорость перемешивания), добавки (например, металлические добавки, сахарные добавки), скорость подачи добавок (например, пеногасителя) и скорость перфузии. В некоторых случаях может быть необходимо корректировать лишь один компонент культуры клеток, чтобы условия в закрытой системе стали оптимальными, тогда как в других случаях может быть необходимо корректировать несколько компонентов культуры клеток. В качестве альтернативы, если определено, что условия не являются оптимальными, или если условия в системе 100 не являются оптимальными даже после корректировки по меньшей мере одного компонента культуры клеток, контроллер и/или оператор системы 100 могут выключать систему 100.

Таким образом, устройства, системы и способы, описанные в данном документе, также снижают риск, связанный с продолжительной работой системы 100, когда условия не являются оптимальными или когда по иной причине нежелательно продолжение работы системы 100. В частности, риск можно снижать путем определения (например, вычисления или получения) данных параметров процесса и качества продукта, например, pH, температуры, растворимости кислорода, жизнеспособности клеток, плотности клеток, титра, агрегации, варианта зяряда, гликозилирования и т.д., ассоциированных с текущей работой системы 100, определения того, удовлетворяют ли данные параметров процесса и качества продукта заранее заданному пороговому значению риска (определенному перед началом работы системы 100 с помощью контроллера, такого как контроллер 132, и/или в ответ на входной сигнал от оператора системы 100), а затем определения того, продолжать ли, прекращать или корректировать работу системы 100 на основании того, удовлетворяют ли данные параметров процесса и качества продукта заранее заданному пороговому значению риска. Например, заранее заданное пороговое значение риска можно определять путем (1) применения доступных данных параметров процесса и данных качества продукта для расчета средних ретроспективных многомерных (MV) данных, ассоциированных с предыдущей работой системы 100 или какой-то другой аналогичной системы, а затем (2) установления рассчитанных средних ретроспективных MV данных в качестве порогового значения (пороговое значение может представлять собой рассчитанные средние ретроспективные MV данные сами по себе или некоторое значение или набор значений на основе рассчитанных средних ретроспективных MV данных). В одном примере заранее заданное пороговое значение риска может представлять собой приемлемое отклонение (например, три стандартных отклонения) от рассчитанных средних ретроспективных MV данных. В качестве альтернативы или дополнения, заранее заданное пороговое значение риска можно определить на основе входного сигнала от оператора системы 100. В некоторых случаях система 100 может быть выключена, когда данные параметров процесса и качества продукта, ассоциированные с текущей работой системы 100, не удовлетворяют (например, превышают) заранее заданное пороговое значение риска. Однако в других случаях система 100 может корректироваться, когда данные параметров процесса и качества продукта, ассоциированные с текущей работой системы 100, не удовлетворяют заранее заданному пороговому значению риска, или даже когда данные параметров процесса и качества продукта удовлетворяют, но близки к заранее заданному пороговому значению риска. Например, и как вкратце обсуждается выше, можно корректировать частоту забора образцов из резервуара 136.

Кроме того, заявитель обнаружил, что устройства, системы и способы, описанные в данном документе, также позволяют продлевать производственные циклы с применением системы 100. Традиционные процессы, как правило, предусматривают производственные циклы максимальной длительностью 32-40 дней. Однако заявитель обнаружил, что устройства, системы и способы, описанные в данном документе, делают возможными 50-80, если не 100-кратные удвоения популяции, т.е. примерно 50-80, если не 100-дневные производственные циклы. Таким образом, можно получать большее количество продукта, пока работа системы 100 отслеживается, чтобы гарантировать то, что продукт удовлетворяет показателям качества, а риск снижен.

В данном документе описаны предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, включая наилучший способ или способы, известные авторам настоящего изобретения, для осуществления настоящего изобретения. Хотя в данном документе показаны и описаны многочисленные примеры, специалисты в данной области техники легко поймут, что детали различных вариантов осуществления не должны быть взаимоисключающими. Вместо этого, специалисты в данной области техники после прочтения представленных в данном документе идей смогут скомбинировать один или несколько признаков одного варианта осуществления с одним или несколькими признаками остальных вариантов осуществления. Кроме того, также следует понимать, что проиллюстрированные варианты осуществления являются лишь иллюстративными и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Все способы, описанные в данном документе, можно выполнять в любом удобном порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Использование всех без исключения примеров или вводных слов (например, "такой как"), представленных в данном документе, предназначено исключительно для лучшего освещения аспектов иллюстративного варианта осуществления или вариантов осуществления настоящего изобретения и не налагает ограничения на объем

настоящего изобретения. Ни одна формулировка в настоящем описании не должна истолковываться как указывающая на какой-либо незаявленный элемент как существенный для практической реализации настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ подготовки образца в режиме реального времени для анализа гликанов, причем способ предусматривает стадии:

(a) перемещения образца, содержащего полипептиды, в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик и многопортовый клапан, при этом многопортовый клапан соединен по текучей среде с удерживающим змеевиком и расположен после него, а колонка для связывания полипептидов связана по текучей среде с многопортовым клапаном и расположена после него;

(b) связывания полипептидов в образце с колонкой для связывания полипептидов;

(c) перемещения гликаназ в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик и многопортовый клапан для высвобождения гликанов из связанных полипептидов;

(d) перемещения раствора-носителя в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик и многопортовый клапан, и сквозь колонку для связывания полипептидов, за счет чего высвобожденные гликаны перемещаются из колонки для связывания полипептидов;

(e) смешивания высвобожденных гликанов с реагентом для мечения гликанов после колонки для связывания полипептидов;

(f) перемещения через многопортовый клапан смеси высвобожденных гликанов и реагента для мечения гликанов в реакционный змеевик, смонтированный после колонки для связывания полипептидов;

(g) инкубирования смеси высвобожденных гликанов и реагента для мечения гликанов в реакционном змеевике, за счет чего осуществляется мечение гликанов;

(h) перемещения смеси в охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционного змеевика;

(i) снижения температуры смеси с помощью охлаждающего змеевика;

(j) перемещения охлажденной смеси в колонку для связывания гликанов, смонтированную после охлаждающего змеевика;

(k) связывания меченых гликанов с колонкой для связывания гликанов;

(l) перемещения через многопортовый клапан элюирующего буфера в колонку для связывания гликанов и сквозь колонку для связывания гликанов с элюированием меченых гликанов, связанных с колонкой для связывания гликанов.

2. Способ по п.1, где одна или несколько из (a), (c), (d), (e), (f), (h), (j) и (l) выполняются автоматически.

3. Способ по п.1 или 2, где (a)-(l) выполняются в закрытой системе.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно предусматривающий после (e) и перед (f) перемещение смеси в вакуум-аппарат, смонтированный после реакционного змеевика и до колонки для связывания гликанов, и практически полное удаление пузырьков газа из смеси высвобожденных гликанов и реагента для мечения гликанов с помощью вакуум-аппарата.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно предусматривающий после (l) перемещение элюированных гликанов сквозь смесительную камеру, смонтированную после колонки для связывания гликанов.

6. Способ по любому из предыдущих пунктов, где (a) предусматривает перемещение образца из резервуара, содержащего образец, в колонку для связывания полипептидов.

7. Способ по п.6, где резервуар предусматривает биореактор.

8. Способ по любому из предыдущих пунктов, где (g) предусматривает флуоресцентное мечение гликанов с помощью реагента для мечения гликанов.

9. Способ по любому из предыдущих пунктов, где (g) предусматривает подвод тепла к смеси в реакционном змеевике.

10. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно предусматривающий (m) перемещение элюированных гликанов из колонки для связывания гликанов в устройство для анализа гликанов.

11. Способ по п.10, дополнительно предусматривающий (n) отделение и количественную оценку гликанов с применением устройства для анализа гликанов.

12. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно предусматривающий перемещение трехходового клапана, соединенного по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов и помещенного после нее, в первое положение, при котором трехходовой клапан направляет оставшуюся часть образца, которая перетекает сквозь колонку для связывания полипептидов, в камеру для отходов.

13. Способ по п.12, дополнительно предусматривающий перед (e) перемещение трехходового клапана во второе положение, при котором трехходовой клапан направляет высвобожденные гликаны из колонки для связывания полипептидов в направлении реагента для мечения гликанов.

14. Способ подготовки образца в режиме реального времени для анализа гликанов в закрытой системе, содержащей многопортовый клапан, удерживающий змеевик до многопортового клапана, колонку для связывания

полипептидов, соединенную по текучей среде с первым портом многопортового клапана и расположенную после него, реакционный змеевик, смонтированный после колонки для связывания полипептидов, охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционного змеевика, и колонку для связывания гликанов, смонтированную после охлаждающего змеевика и соединенную по текучей среде со вторым портом многопортового клапана и расположенную после него, причем способ предусматривает:

(a) перемещение под управлением контроллера, связанного коммуникационным взаимодействием с закрытой системой, образца, содержащего полипептиды, из резервуара, содержащего полипептиды, в удерживающий змеевик;

(b) установку под управлением контроллера многопортового клапана в первое положение, при котором удерживающий змеевик соединен по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов через первый порт многопортового клапана, так что образец перетекает в колонку для связывания полипептидов, в результате чего практически все полипептиды в образце связываются с первой колонкой для полипептидов;

(c) когда многопортовый клапан находится в первом положении, перемещение под управлением контроллера гликолиз в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик для высвобождения гликанов из связанных полипептидов, а затем перемещение под управлением контроллера раствора-носителя в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик и сквозь колонку для связывания полипептидов, за счет чего высвобожденные гликаны перемещаются из колонки для связывания полипептидов;

(d) перемещение под управлением контроллера высвобожденных гликанов в направлении реакционного змеевика;

(e) перемещение под управлением контроллера реагента для мечения гликанов в направлении высвобожденных гликанов перед их попаданием в реакционный змеевик, так что реагент для мечения гликанов смешивается с высвобожденными гликанами и ферментами;

(f) перемещение под управлением контроллера смеси в реакционный змеевик, в результате чего происходит мечение гликанов в смеси;

(g) перемещение под управлением контроллера смеси в охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционного змеевика, за счет чего температура смеси снижается;

(h) перемещение под управлением контроллера охлажденной смеси в колонку для гликанов, смонтированную после охлаждающего змеевика, в результате чего меченые гликаны связываются с колонкой для связывания гликанов;

(i) установку под управлением контроллера многопортового клапана во второе положение, при котором колонка для связывания гликанов соединена по текучей среде с источником раствора элюирующего буфера через второй порт многопортового клапана;

(j) когда многопортовый клапан находится во втором положении, перемещение под управлением контроллера элюирующего буфера из источника элюирующего буфера в колонку для связывания гликанов и сквозь колонку для связывания гликанов, за счет чего элюируются гликаны, связанные с колонкой для связывания гликанов; и

(k) перемещение под управлением контроллера элюированных гликанов в устройство для анализа гликанов.

15. Способ по п.14, дополнительно предусматривающий после (e) и перед (f) перемещение под управлением контроллера смеси в вакуум-аппарат, смонтированный после колонки для связывания полипептидов и до реакционного змеевика, за счет чего из смеси практически полностью удаляются пузырьки газа.

16. Способ по п.14 или 15, дополнительно предусматривающий после (j) и перед (k) перемещение под управлением контроллера элюированных гликанов сквозь смесительную камеру, смонтированную после колонки для связывания гликанов и до устройства для анализа гликанов.

17. Способ по любому из пп.14-16, дополнительно предусматривающий управление с помощью процессора колонкой для связывания полипептидов для поддержания колонки для связывания полипептидов при температуре приблизительно 38°C.

18. Способ по любому из пп.14-17, дополнительно предусматривающий управление с помощью процессора реакционным змеевиком для поддержания реакционного змеевика при температуре приблизительно 80°C.

19. Способ по любому из пп.14-18, где (f) предусматривает перемещение под управлением контроллера смеси в реакционный змеевик, в результате чего осуществляется флуоресцентное мечение гликанов в смеси.

20. Закрытая система для подготовки образца в режиме реального времени для анализа гликанов, причем закрытая система содержит

биореактор, обладающий возможностью содержать полипептиды;

удерживающий змеевик, соединенный по текучей среде с биореактором и смонтированный для приема образца полипептидов из биореактора;

многопортовый клапан, соединенный по текучей среде с удерживающим змеевиком и помещенный после него;

колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированную для приема образца из удерживающего змеевика через первый порт многопортового клапана;

источник глюконаз, соединенный по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированный для подачи глюконаз в колонку для связывания полипептидов, так что глюконазы проникают в полипептиды, связанные с колонкой для связывания полипептидов;

источник раствора-носителя, соединенный по текучей среде с многопортовым клапаном и смонтированный для подачи раствора-носителя в колонку для связывания полипептидов, где раствор-носитель обладает возможностью высвобождения и переноса гликанов из колонки для связывания полипептидов;

первый насос, смонтированный после колонки для связывания полипептидов, чтобы направлять реагент для мечения гликанов в направлении высвобожденных гликанов, переносимых из колонки для связывания полипептидов, так что реагент для мечения гликанов смешивается с гликанами;

реакционный змеевик, смонтированный после колонки для связывания полипептидов и первого насоса, причем реакционный змеевик обладает возможностью приема смеси, содержащей реагент для мечения гликанов и высвобожденные гликаны, и обеспечения мечения высвобожденных гликанов;

охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционного змеевика и обладающий возможностью приема смеси из реакционного змеевика, причем охлаждающий змеевик выполнен с возможностью снижения температуры смеси;

колонку для связывания гликанов, соединенную по текучей среде с охлаждающим змеевиком и с многопортовым клапаном через второй порт многопортового клапана, причем колонка для связывания гликанов выполнена с возможностью связывания практически всех меченых гликанов, колонка для связывания гликанов обладает возможностью приема раствора элюирующего буфера через второй порт многопортового клапана, где раствор элюирующего буфера элюирует связанные меченые гликаны и переносит элюированные меченые гликаны в устройство для анализа гликанов после колонки для связывания гликанов.

21. Система по п.20, дополнительно содержащая вакуум-аппарат, смонтированный до реакционного змеевика и после колонки для связывания полипептидов и первого насоса, причем вакуум-аппарат выполнен с возможностью практически полного удаления пузырьков газа из смеси, содержащей реагент для мечения гликанов и высвобожденные гликаны.

22. Система по п.20 или 21, дополнительно содержащая смесительную камеру, смонтированную после колонки для связывания полипептидов и до реакционного змеевика, где смесительная камера облегчает корректировку компонента элюирующего буфера с мечеными гликанами, чтобы он соответствовал начальному состоянию хроматографической подвижной фазы.

23. Система по любому из пп.20-22, где многопортовый клапан представляет собой клапан с 12 периферическими портами и центральным общим портом.

24. Система по любому из пп.20-23, где колонка для связывания полипептидов выбрана из группы, состоящей из колонки с белком А, колонки с белком G, колонки с белком A/G, колонки с белком L, колонки для разделения аминокислот, колонки с авидином, колонки со стрептавидином, колонки для связывания углеводов, колонки для разделения углеводов, колонки с глутатионом, колонки с гепарином, колонки для гидрофобных взаимодействий, иммуноаффинной колонки, колонки для разделения нуклеотидов/коферментов, специализированной колонки и колонки для аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (ИМАС).

25. Система по любому из пп.20-24, где глюконазы выбраны из группы, состоящей из эндогликозидаз, гликозамидаз и O-гликаназ, а также их комбинаций.

26. Система по любому из пп.20-25, дополнительно содержащая второй насос, смонтированный до многопортового клапана, для прокачивания образца полипептидов из резервуара в удерживающий змеевик.

27. Система по любому из пп.20-26, дополнительно содержащая контроллер, связанный коммуникационным взаимодействием с многопортовым клапаном, причем контроллер выполнен с возможностью избирательно открывать и закрывать первый и второй порты многопортового клапана.

28. Система по любому из пп.20-27, дополнительно содержащая нагревательный элемент, установленный непосредственно вблизи реакционного змеевика, причем нагревательный элемент выполнен с возможностью поддержания реакционного змеевика при температуре приблизительно 80°C.

29. Закрытая система для подготовки образца в режиме реального времени для анализа гликанов, причем закрытая система содержит

многопортовый клапан;

удерживающий змеевик, расположенный до многопортового клапана;

колонку для связывания полипептидов, соединенную по текучей среде с первым портом многопортового клапана и расположенную после него;

реакционный змеевик, смонтированный после колонки для связывания полипептидов;

охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционного змеевика;
 колонку для связывания гликанов, соединенную по текучей среде с охлаждающим змеевиком и расположенную после него, причем колонка для связывания гликанов соединена по текучей среде с многопортовым клапаном через второй порт многопортового клапана; и

контроллер, связанный коммуникационным взаимодействием с многопортовым клапаном и содержащий запоминающее устройство, процессор и алгоритм, хранящийся в запоминающем устройстве и исполняемый процессором для:

- (a) перемещения образца продукта, содержащего полипептиды, в удерживающий змеевик;
- (b) установки многопортового клапана в первое положение, при котором удерживающий змеевик соединен по текучей среде с колонкой для связывания полипептидов через первый порт многопортового клапана, так что образец перетекает в первую колонку, в результате чего практически все полипептиды в образце связываются с колонкой для связывания полипептидов;
- (c) когда многопортовый клапан находится в первом положении, перемещение глюканаза в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик для высвобождения гликанов из связанных полипептидов, а затем перемещение раствора-носителя в колонку для связывания полипептидов через удерживающий змеевик и сквозь колонку для связывания полипептидов, за счет чего практически все высвобожденные гликаны перемещаются из колонки для связывания полипептидов;
- (d) перемещения высвобожденных гликанов в направлении реакционного змеевика;
- (e) перемещения реагента для мечения гликанов в направлении высвобожденных гликанов перед их попаданием в реакционный змеевик, так что реагент для мечения гликанов смешивается с высвобожденными гликанами;
- (f) перемещения смеси высвобожденных гликанов и реагента для мечения гликанов в реакционный змеевик, в результате чего происходит мечение гликанов в смеси;
- (g) перемещения смеси в охлаждающий змеевик, смонтированный после реакционного змеевика, где охлаждающий змеевик снижает температуру смеси;
- (h) перемещения смеси в колонку для связывания гликанов, в результате чего меченые гликаны связываются с колонкой для связывания гликанов;
- (i) установки многопортового клапана во второе положение, при котором колонка для связывания гликанов соединена по текучей среде с источником раствора элюирующего буфера через второй порт многопортового клапана; и
- (j) когда многопортовый клапан находится во втором положении, перемещение элюирующего буферного раствора из источника раствора элюирующего буфера в колонку для связывания гликанов и сквозь колонку для связывания гликанов, за счет чего элюируются гликаны, связанные с колонкой для связывания гликанов.

30. Система по п.29, дополнительно содержащая вакуум-аппарат, смонтированный до реакционного змеевика и после колонки для связывания полипептидов и первого насоса, причем вакуум-аппарат выполнен с возможностью практически полного удаления пузырьков газа из смеси, содержащей реагент для мечения гликанов и высвобожденные гликаны.

31. Система по п.29 или 30, дополнительно содержащая смесительную камеру, смонтированную после колонки для связывания полипептидов и до реакционного змеевика, где смесительная камера действует на корректировку компонента элюирующего буфера с мечеными гликанами, чтобы он соответствовал начальному состоянию хроматографической подвижной фазы.

32. Система по любому из пп.29-31, где алгоритм, исполняемый процессором, перемещает образец из резервуара, содержащего образец, в удерживающий змеевик.

33. Система по любому из пп.29-32, где резервуар предусматривает биореактор.

34. Система по любому из пп.29-33, где алгоритм, исполняемый процессором, перемещает элюированные гликаны из колонки для связывания гликанов в устройство для анализа гликанов.

35. Система по любому из пп.29-34, где колонка для связывания полипептидов выбрана из группы, состоящей из колонки с белком А, колонки с белком G, колонки с белком A/G, колонки с белком L, колонки для разделения аминокислот, колонки с авидином, колонки со стрептавидином, колонки для связывания углеводов, колонки для разделения углеводов, колонки с глутатионом, колонки с гепарином, колонки для гидрофобных взаимодействий, иммуноаффинной колонки, колонки для разделения нуклеотидов/коферментов, специализированной колонки и колонки для аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (ИМАС).

36. Система по любому из пп.29-35, где глюканызы выбраны из группы, состоящей из эндогликозидаз, гликозамидаз и O-гликаназа, а также их комбинаций.

37. Система по любому из пп.29-36, где колонка для связывания гликанов представляет собой колонку с пористым графитизированным углеродом.

38. Система по любому из пп.29-37, где реагент для мечения гликанов представляет собой флуорофор или хромофор.

39. Система по любому из пп.29-38, где контроллер выполнен с возможностью поддержания колонки для связывания полипептидов при температуре приблизительно 38°C.

40. Система по п.39, где контроллер выполнен с возможностью поддержания реакционного змеевика при температуре приблизительно 80°C.

41. Система по любому из пп.20-40, где полипептид из продукта представляет собой терапевтический полипептид.

42. Система по п.41, где терапевтический полипептид выбран из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, производного антитела или фрагмента антитела или слитого полипептида.

43. Система по п.42, где антитело выбрано из инфликсимаба, бевацизумаба, ранибизумаба, цетуксимаба, паливизумаба, абаговомаба, абциксимаба, актоксумаба, адалимумаба, афелимомаба, афутузумаба, алацизумаба, алацизумаба пегола, ald518, алемтузумаба, алирокумаба, алемтузумаба, альгумомаба, аматуксимаба, анатумомаба мафенатокса, анрукинзумаба, аполизумаба, арцитумомаба, азелизумаба, алтинумаба, атлизумаба, аторолимиумаба, тоцилизумаба, бапинеузумаба, базиликсимаба, бавитуксимаба, бектумомаба, белимумаба, бенрализумаба, бертилимумаба, безилесомаба, бевацизумаба, безлотоксумаба, бициромаба, биватузумаба, биватузумаба мертанзина, блинатумомаба, блосозумаба, брентуксимаба ведотина, бриакинумаба, бродалумаба, канакинумаба, кантузумаба мертанзина, кантузумаба мертанзина, каплацизумаба, капромаба пендетида, карлумаба, катумаксумаба, сс49, цеделизумаба, цертолизумаба пегола, тетраксимаба, цитатузумаба богатокса, циксутумумаба, клазакизумаба, кленоликсимаба, кливатузумаба цетраксетана, конатумумаба, кренезумаба, сг6261, дацетузумаба, даклизумаба, далотузумаба, даратумумаба, демцизумаба, деносумаба, детумомаба, дорлимомаба аритокса, дрозитумаба, дулиготумаба, дупилумаба, экроексимаба, экулизумаба, эдобакомаба, эдреколомаба, эфализумаба, эфунгумаба, элотузумаба, эсилимомаба, энаватузумаба, энлимомаба пегола, энокизумаба, энотикумаба, энситуксимаба, эпитумомаба цитуксетана, эпратузумаба, эрлизумаба, эртумаксумаба, этарацизумаба, этролизумаба, эксбивирумаба, эксбивирумаба, фанолесомаба, фаралимомаба, фарлетузумаба, фасинумаба, fbta05, фелвизумаба, фезакинумаба, фиклатузумаба, фигитумумаба, фланвотумаба, фонтолизумаба, форалумаба, форапавирумаба, фрезолимумаба, фулранумаба, футуксимаба, галиксимаба, ганитумаба, гантенерумаба, гавилимомаба, гемтузумаба озогамидина, гевокизумаба, гирентуксимаба, глембатумумаба ведотина, голимумаба, гомиликсимаба, gs6624, ибализумаба, ибритумомаба тиуксетана, икрукумаба, иговомаба, имциромаба, имгатузумаба, инклакумаба, индатуксимаба равтанзина, инфликсимаба, интетумумаба, инолимомаба, инотузумаба озогамидина, ипилимумаба, иратумумаба, итолизумаба, иксекизумаба, келиксимаба, лабетузумаба, лебрикизумаба, лемалезомаба, лерделимумаба, лексатумумаба, либивирумаба, лигелизумаба, линтузумаба, лирилумаба, лорвотузумаба мертанзина, лукатумумаба, лумиликсимаба, мапатумумаба, маслимомаба, маврилимумаба, матузумаба, меполизумаба, метелимумаба, милатузумаба, минретумомаба, митумомаба, могамулизумаба, моролимумаба, мотавизумаба, моксетумомаба пасудотокса, муромонаба-cd3, наколомаба тафенатокса, намилумаба, наптумомаба эстафенатокса, нарнутумаба, натализумаба, небакумаба, нецитумумаба, нерелимомаба, несвакумаба, нимотузумаба, ниволумаба, нофетумомаба мерпентана, окаратузумаба, окрелизумаба, одулимомаба, офатумумаба, оларатумаба, олокизумаба, омализумаба, онартузумаба, опортузумаба монатокса, ореговомаба, ортикумаба, отеликсизумаба, окселумаба, озанезумаба, озорализумаба, пагибаксимаба, паливизумаба, панитумумаба, панобакумаба, парсатузумаба, пасколизумаба, патеклизумаба, патритумаба, пемтумомаба, перакизумаба, пертузумаба, перселлизумаба, пидилизумаба, пинтумомаба, плакулумаба, понезумаба, приликсимаба, притумумаба, PRO 140, квиллизумаба, ракотумомаба, радретумаба, рафивирумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, регавирумаба, реслизумаба, рилотумумаба, ритуксимаба, робатумумаба, роледумаба, ромосозумаба, ронтализумаба, ровелизумаба, руплизумаба, самализумаба, сарилумаба, сатумомаба пендетида, секукинумаба, севирумаба, сибротузумаба, сифалимумаба, силтуксимаба, симтузумаба, сиплизумаба, сирукумаба, соланезумаба, солитомаба, сонепцизумаба, сонтузумаба, стамулумаба, сулесомаба, сувизумаба, табалумаба, такатузумаба тетраксетана, тадоцизумаба, тализумаба, танезумаба, таплитумомаба паптокса, тефибазумаба, телимомаба аритокса, тенатумомаба, тефибазумаба, телимомаба аритокса, тенатумомаба, тенеликсимаба, теплизумаба, тепротумумаба, тезепелумаба, TGN1412, тремелимумаба, тицилимумаба, тилдракизумаба, тигатузумаба, TNX-650, тоцилизумаба, торализумаба, тозитумомаба, тралокинумаба, трастузумаба, TRBS07, трегализумаба, тремелимумаба, тукотузумаба целмолейкина, тувирумаба, ублитуксимаба, урелумаба, уртоксазумаба, устекинумаба, вапаликсимаба, вателизумаба, ведолизумаба, велтузумаба, вепалимомаба, весенкумаба, висилизумаба, волоциксимаба, ворсетузумаба мафодотина, вотумумаба, залутумумаба, занолимумаба, затуксимаба, зиралимумаба или золимомаба аритокса.

44. Система по п.42, отличающаяся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антиамилоидом, GMCSF, CGRPR, RANKL, склеростином, IL-1R1, миостатином, B7RP1, амилоидом, GMCSF, CGRP, PCSK9, гепсидином, TNFR p55, OX40L, HGF, глюкогоном R, склеростином, CD-22, INFgR, Ang2, TRAILR2, EGFR, IL-4R, IL-15, IGF1R, IL-17R, Dkk1, TSLP, GIPR, активином, c-fms или $\alpha 4\beta 7$.

45. Система по п.41, где терапевтический полипептид выбран из гликопротеина, полипептида CD, полипептида рецептора HER, полипептида клеточной адгезии, полипептида фактора роста, полипептида инсулина, родственного инсулину полипептида, коагуляционного полипептида, родственного коагуляционному полипептида, альбумина, IgE, антигена группы крови, колониестимулирующего фактора, рецептора, нейротрофического фактора, интерферона, интерлейкина, вирусного антигена, липопротеина, кальцитонина, глюкогона, предсердного натрийуретического фактора, легочного сурфактанта, фактора некроза опухоли-альфа и -бета, энкефалиназы, ассоциированного с мышечным гонадотропином пептида,

ДНКазы, ингибина, активина, интегрина, белка А, белка D, ревматоидного фактора, иммунотоксина, костного морфогенетического белка, супероксиддисмутазы, поверхностного мембранного полипептида, фактора ускорения распада, белка оболочки вируса, вызывающего СПИД, транспортного полипептида, "хоминг"-рецептора, адресина, регуляторного полипептида, иммуноадгезина, миостатина, полипептида TALL, амилоидного полипептида, стромального лимфопоэтина тимуса, лиганда RANK, полипептида c-kit, рецептора TNF ангиопоэтина или их биологически активных фрагментов, аналогов или вариантов.

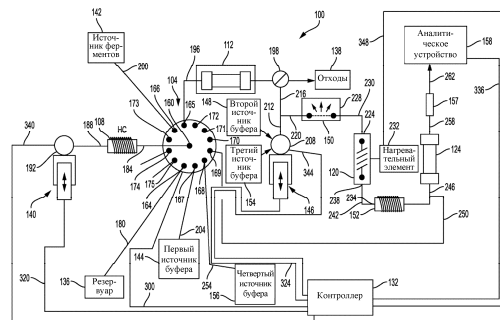
46. Способ отслеживания встроенного анализа в режиме реального времени, выполняемого закрытой системой по п.20 или 29, причем способ предусматривает определение того, удовлетворяют ли условия в закрытой системе заранее заданному порогу эффективности анализа; и если определено, что условия в закрытой системе не удовлетворяют заранее заданному порогу эффективности анализа, корректировку по меньшей мере одного компонента культуры клеток до тех пор, пока условия в закрытой системе не будут удовлетворять заранее заданному порогу эффективности анализа, где корректировка по меньшей мере одного компонента культуры клеток включает регуляцию одного или нескольких из pH, давления, температуры, потока среды, состава среды, стратегии снабжения газами, перемешивания, состава добавок, скорости подачи добавок или скорости перфузии.

47. Способ снижения риска, связанного с продолжением работы закрытой системы по п.20 или 29, когда условия не являются оптимальными или когда продолжение работы системы по другим причинам нежелательно, при этом способ предусматривает

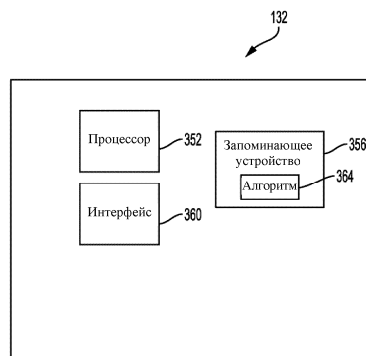
определение данных процесса и качества продукта, ассоциированных с работой закрытой системы по п.20 или 29, где данные о качестве процесса и продукта включают по меньшей мере одно из pH, температуры, растворения кислорода, жизнеспособности клеток, плотности клеток, титра, агрегации, варианта заряда или гликозилирования;

определение того, соответствуют ли данные процесса и качества продукта заранее заданному пороговому значению риска; и

определение того, продолжать ли работу закрытой системы на основе того, удовлетворяют ли данные процесса и качества продукта заранее заданному пороговому значению риска.

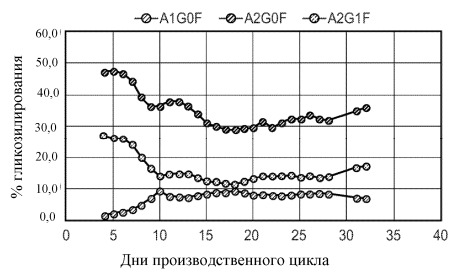


Фиг. 1

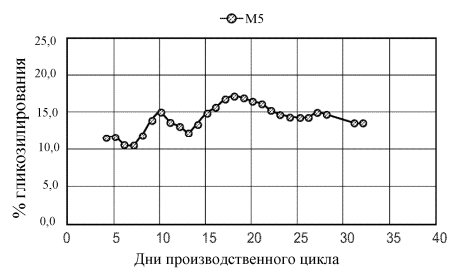


Фиг. 2

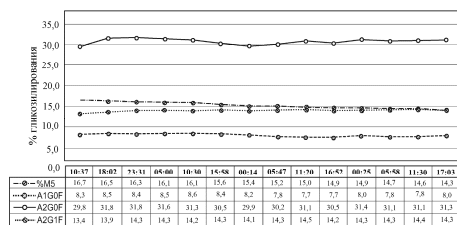
043925



Фиг. 3А

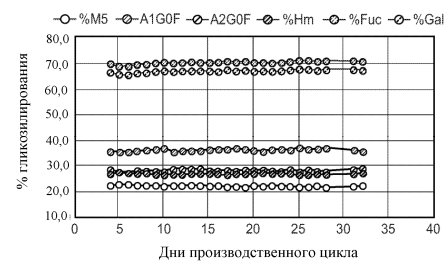


Фиг. 3В

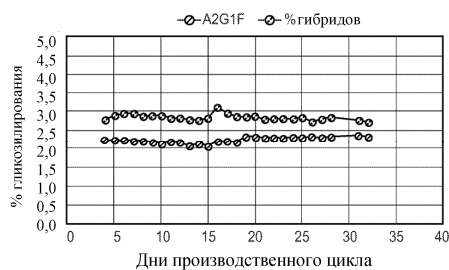


Фиг. 3С

	10-17	18-02	7-11	05-08	10-18	15-08	08-14	05-07	11-20	16-07	08-14	05-08	11-20	17-03
—○— M5	16,7	16,5	16,3	16,1	16,1	15,6	15,4	15,2	15,0	14,9	14,9	14,7	14,6	14,3
—□— A1G0F	8,3	8,5	8,4	8,5	8,6	8,4	8,2	7,8	7,7	7,7	8,0	7,8	7,9	8,0
—△— A2G0F	29,8	31,8	31,8	31,6	31,9	30,5	29,0	30,2	31,1	30,5	31,4	31,1	31,2	31,9
—◇— A2G1F	13,4	13,9	14,3	14,3	14,2	14,3	14,1	14,3	14,5	14,2	14,3	14,3	14,4	14,3



Фиг. 3Д



Фиг. 3Е



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2