

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045662**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.14

(21) Номер заявки
202092203

(22) Дата подачи заявки
2019.03.15

(51) Int. Cl. **C07K 16/22** (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) ВОДНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ БУФЕР (ВАРИАНТЫ), СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ИЛИ ПРИМЕСЕЙ В ОБРАЗЦЕ БЕЛКОВОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА, НАБОР ДЛЯ МИКРОЧИПОВОГО КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

(31) 62/644,933

(32) 2018.03.19

(33) US

(43) 2020.12.07

(86) PCT/US2019/022525

(87) WO 2019/182901 2019.09.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
**Рилман Тимоти, Каро Габриэль,
Шнайдерхайнце Джеффри, Нолл
Николь М. (US)**

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

(56) WO-A1-2014116596

PETER WESTERMANN ET AL: "The [alpha] and [gamma] subunits of initiation factor eIF-2 can be cross-linked to 18S ribosomal RNA within the quaternary initiation complex, eIF-2-Met-tRNA f GDPCP small ribosomal subunit", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 8, no. 14, 25 July 1980 (1980-07-25), pages 3065-3071, XP055594041, ISSN: 0305-1048 Section: Isolation of covalently linked complexes between eIF-2 subunits and rRNA; page 3067

SINCLAIR J F ET AL: "Improved retention of heme with increased resolution of microsomal proteins in polyacrylamide gel electrophoresis", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 114, no. 2, 1 July 1981 (1981-07-01), pages 316-321, XP024818513, ISSN: 0003-2697, DOI:10.1016/0003-2697(81)90487-5 [retrieved on 1981-07-01] page 318 Caption of figure 1A and B
WO-A2-2006020498

(57) Представлены способы анализа и реагенты для МСЕ для оценки чистоты и выявления примесей в образцах белковых фармацевтических продуктов. Представлены методы определения аналитов в образце белкового лекарственного средства. Заявлен водный электрофоретический буфер для образца белкового лекарственного средства, (варианты). Также заявлен способ выявления загрязнений или примесей в образце белкового лекарственного средства, причем способ включает стадии: добавления образца белкового лекарственного средства к описанному водному электрофоретическому буферу. Также заявлен набор для микрочипового капиллярного электрофореза (МСЕ), содержащий указанный водный электрофоретический буфер и письменные инструкции.

045662
B1

045662
B1

Описание изобретения

Аспекты изобретения в общем относятся к области капиллярного электрофореза, в частности, к микрочиповому капиллярному электрофорезу.

Уровень техники

Внедрение надежных, воспроизводимых, удобных для пользователя технологий имеет решающее значение для соответствия требованиям проведения испытаний для биологических препаратов, предъявляемым к современным лабораториям контроля качества (КК, QC). Усовершенствования методов являются необходимыми для обеспечения повышения производительности, сохраняя при этом возможности получения качественных аналитических данных и пытаясь минимизировать количество некорректных результатов испытаний и исследований, связанных с оборудованием. Хотя электрофорез исторически используется при КК для определения чистоты и фрагментации продукта, методология была перенесена с электрофореза в геле на капиллярный, а позднее на микрочиповый. Микрочиповый капиллярный электрофорез (МСЕ) позволяет существенно снизить время анализа образцов, при этом сохраняя стандарты производительности и воспроизводимости, требуемые для анализа КК (Ouimet, C, et al., Expert Opin Drug Discov., 12(2): 213-224 (2017)).

Хотя МСЕ возник как перспективный метод с растущим применением в фармацевтической промышленности для характеристики биофармацевтических препаратов, контроля качества и поиска новых лекарственных средств, он может быть подвержен мешающим влияниям при проведении анализа.

Таким образом, задачей изобретения является предложить улучшенные способы анализа МСЕ и композиции, которые уменьшают искажение результатов при проведении анализа.

Другой задачей изобретения является предложить анализы МСЕ и композиции для улучшения обнаружения примесей в белковом фармацевтическом продукте.

Сущность изобретения

Представлены способы анализа и реагенты для МСЕ для оценки чистоты и выявления примесей в образцах белковых фармацевтических продуктов. Представлены способы определения аналитов в образце белкового лекарственного средства. Предпочтительные белковые лекарственные средства включают, но не ограничиваются ими, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, слитые белки и рекомбинантные белки. В способах анализа задействованы методы МСЕ для разделения, идентификации и количественного определения белкового продукта и примесей в белковом продукте. Примеси включают, но не ограничиваются ими, агрегаты белков, фрагменты белков, белковые мультимеры и загрязнения, внесенные при анализе. Также представлены восстанавливающие и невосстанавливающие буферы.

В одном варианте осуществления изобретения предложен невосстанавливающий водный электрофоретический буфер для образца, содержащий алкилирующий агент, например от 155 до 175 мМ 2-йодацетамида; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 65 до 95 мМ фосфата натрия, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 7. В предпочтительном варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 6. В другом варианте осуществления изобретения водный буфер содержит 166 мМ 2-йодацетамида, 0,81% додецилсульфата лития и 81 мМ фосфата натрия.

Также предложен восстанавливающий буфер. В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер представляет собой водный электрофоретический буфер для образца, содержащий от 0,5 до 1,5% додецилсульфата лития, от 55 до 85 мМ фосфата натрия и восстанавливающий агент, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН выше 8. В предпочтительном варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 9. В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер содержит от 135 до 155 мМ дитиотреитола. В еще одном варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий буфер, содержащий 0,69% додецилсульфата лития, 69 мМ фосфата натрия и 142 мМ дитиотреитола.

Буферы на основе HEPES также можно использовать в раскрытых способах. В одном варианте осуществления изобретения предложен невосстанавливающий водный электрофоретический буфер для образца на основе HEPES, содержащий алкилирующий агент, например от 55 до 75 мМ 2-йодацетамида; от 0,1 до 1,0% додецилсульфата лития; от 5 до 85 мМ HEPES; и от 5 до 115 мМ хлорида натрия, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 9. В другом варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 8. В еще одном варианте осуществления изобретения водный буфер содержит 66,4 мМ 2-йодацетамида, 0,32% додецилсульфата лития, 16,2 мМ HEPES и 48,6 мМ хлорида натрия.

В другом варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий водный электрофоретический буфер для образца на основе HEPES, содержащий от 0,05 до 0,75% додецилсульфата лития, от 5 мМ до 115 мМ хлорида натрия, от 5 мМ до 115 мМ HEPES и восстанавливающий агент, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН выше 7. В предпочтительном варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 8. В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер содержит от 35 до 50 мМ дитиотреитола. В еще одном варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий буфер, содержащий 0,28% додецилсульфата лития, 41,5 мМ хлорида натрия, 13,8 мМ HEPES и 42,5 мМ дитиотреитола.

В одном варианте осуществления изобретения предложен способ невосстанавливающего МСЕ для

выявления загрязнений или примесей в образце белкового лекарственного средства, включающий стадии добавления образца белка к невосстанавливающему буферу, обсуждаемому выше, с образованием забуференного образца белкового лекарственного средства. Забуференный образец белкового лекарственного средства нагревают до от 65 до 85°C в течение от 5 до 15 мин с образованием денатурированного забуференного образца белкового лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления изобретения забуференный образец белкового лекарственного средства нагревают до 70°C в течение 10 мин.

Образец белкового лекарственного средства смешивают с обнаружимой меткой и нагревают при от 30 до 40°C в течение от 20 до 40 мин с образованием денатурированного меченого образца белкового лекарственного средства. Предпочтительная обнаружимая метка включает, но не ограничивается ими, сложный эфир NHS Dyomics DY-631. Другие обнаружимые метки, которые можно использовать, включают другие красители, флюорофоры, хромофоры, масс-спектрометрические метки, квантовые точки и тому подобное и те, которые описаны в патенте США № 6924372, который включен посредством ссылки в полном объеме. В предпочтительном варианте осуществления изобретения образец белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают до 35°C в течение 30 мин. Избыток метки необязательно удаляют из образца, например с использованием центробежного фильтра.

Денатурированный меченый белковый фармацевтический продукт разбавляют и подвергают МСЕ для разделения разбавленного образца белкового лекарственного средства в системе микроципового капиллярного электрофореза, чтобы получить электрофореграмму. В одном варианте осуществления изобретения конечная концентрация образца с начальной концентрацией при 0,5 мг/мл, которую затем вводят в микрочип, составляет 9 мкг/мл при МСЕ. Электрофореграмма содержит пики, соответствующие белковому фармацевтическому продукту и примесям. Способ завершается идентификацией пиков на электрофореграмме, соответствующих загрязнениям или примесям.

В другом варианте осуществления изобретения предложен способ восстанавливающего МСЕ для идентификации загрязнений или примесей в образце белкового лекарственного средства. Способ начинается с добавления образца белка к любому из восстанавливающих буферов, описанных выше, для получения забуференного образца белкового лекарственного средства. Забуференный образец белкового лекарственного средства денатурируют нагреванием забуференного образца белкового лекарственного средства до от 65 до 85°C, предпочтительно до 70°C, в течение 10 мин с образованием денатурированного образца белкового лекарственного средства. Образец белкового лекарственного средства смешивают с обнаружимой меткой и нагревают при от 30 до 40°C в течение от 20 до 40 мин с образованием денатурированного меченого образца белкового лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления изобретения образец белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают до 35°C в течение 30 мин. Избыток метки необязательно удаляют из образца, например с использованием центробежного фильтра. Предпочтительная обнаружимая метка включает, но не ограничивается ими, сложный эфир NHS Dyomics DY-631. Другие обнаружимые метки, которые можно использовать, включают другие красители, флюорофоры, хромофоры, масс-спектрометрические метки, квантовые точки и тому подобное и те, которые описаны в патенте США № 6924372, который включен посредством ссылки в полном объеме.

В одном варианте осуществления изобретения установленный диапазон концентраций образца для анализа составляет от 0,4 мг/мл до 0,6 мг/мл, что соответствует конечной концентрации, подвергаемой анализу, от около 7 мкг/мл до 11 мкг/мл, которую подвергают МСЕ анализу в системе для микроципового капиллярного электрофореза с получением электрофореграммы. Способ завершается идентификацией пиков на электрофореграмме, соответствующих загрязнениям или примесям.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А иллюстрирует электрофореграмму типичного анализа невосстановленного образца. Фиг. 1В иллюстрирует электрофореграмму типичного анализа восстановленного образца. Ось X представляет время в минутах, а ось Y представляет уровень флуоресценции в относительных единицах (RFU, отн. ед.). Увеличение времени перемещения соответствует увеличению размера белка.

Подробное описание сущности изобретения

I. Определения.

Использование терминов и подобных объектов в единственном числе в контексте описания изобретения, заявленного в данном документе (особенно в контексте формулы изобретения), предназначено для охвата как единственного, так и множественного числа, если иное не указано в данном документе или четко не противоречит контексту.

Перечисление интервалов значений в данном документе предназначено лишь в качестве условного обозначения отдельно каждого конкретного значения, попадающего в интервал, если иное не указано в данном документе, и каждое конкретное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно перечислено в данном документе.

Использование термина "около" предназначено для описания значений или выше, или ниже указанного значения в интервале прилб. $\pm 10\%$; в других вариантах осуществления изобретения значения могут

изменяться по величине или выше, или ниже заявленного значения в интервале прибл. $\pm 5\%$; в других вариантах осуществления изобретения значения могут изменяться по величине или выше, или ниже заявленного значения в интервале прибл. $\pm 2\%$; в других вариантах осуществления изобретения значения могут изменяться по величине или выше, или ниже заявленного значения в интервале прибл. $\pm 1\%$. Предполагается, что предыдущие интервалы проясняются контекстом, и не подразумевается никаких дополнительных ограничений. Все способы, представленные в данном документе, можно осуществлять в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или если это явно не противоречит контексту. Использование любого и всех примеров или иллюстративных фраз (например, "такой как"), представленных в данном документе, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничение на объем изобретения, если иное не заявлено в формуле изобретения. Никакие фразы в описании не следует рассматривать как указывающие на какой-либо незаявленный элемент, существенный для практического осуществления изобретения.

"Белок" относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатков, связанных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды и также может включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксихлирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, белки включают, среди других объектов, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки получают из рекомбинантных клеток различных типов с использованием хорошо известных способов культивирования клеток, и их вводят в клетку с помощью способов генной инженерии (как, например, последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, безинтронная последовательность и т.д.), где она может быть расположена как эписома или встроена в геном клетки.

"Антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, взаимосвязанных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно разделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность, (CDR), перемежку с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными участками (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает как гликозилированные, так и негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает молекулы антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной, чтобы экспрессировать антитело. Термин "антитело" также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним различными эпитопами. Биспецифические антитела в общем описаны в патенте США № 8586713, который включен в данную заявку посредством ссылки.

"Белки слияния с Fc" содержат часть или полностью два или более белков, один из которых представляет собой часть Fc молекулы иммуноглобулина, которые в иных случаях не обнаружены вместе в природе. Описано получение белков слияния, содержащих некоторые гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (в том числе домен Fc), например: Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 10535 (1991); Byrn et al., Nature 344:677 (1990); и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11 (1992). "Белки слияния рецептора с Fc" содержат один или более внеклеточных доменов рецептора, соединенных с фрагментом Fc, который в некоторых вариантах осуществления изобретения содержит шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок слияния с Fc содержит две или более отдельных цепей рецептора, которые связаны с одним или более лигандами. Например, белок слияния с Fc представляет собой ловушку, такую как, например, ловушку ИЛ-1 или ловушку ФРЭС.

Термин "МСЕ" или "микрочиповый капиллярный электрофорез" относится к разделению анализов с помощью капиллярного электрофореза (CE) в микрочип-формате.

II. МСЕ анализы и буферы.

Представлены способы определения анализов в образце белкового лекарственного средства. Предпочтительные белковые лекарственные средства включают, но не ограничиваются ими, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, слитые белки и рекомбинантные белки. В способах анализа задействован метод МСЕ для разделения, идентификации и количественного определения белкового продукта и примесей в белковом продукте. Примеси включают, но не ограничиваются ими, агрегаты белков, фрагменты белков, белковые мультимеры и загрязнения, внесенные при анализе. Также представлены вос-

станавливающие и невосстанавливающие буферы.

А. Буферы.

1. Невосстанавливающие буферы.

В одном варианте осуществления изобретения предложен невосстанавливающий водный электрофоретический буфер для образца, содержащий от 155 до 175 мМ алкилирующего агента, например 2-йодацетамида или NEM; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 75 до 95 мМ фосфата натрия, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 7. В предпочтительном варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 6. В другом варианте осуществления изобретения водный буфер содержит 166 мМ 2-йодацетамида, 0,81% додецилсульфата лития и 81 мМ фосфата натрия.

2. Восстанавливающие буферы.

Также предложен восстанавливающий буфер. В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер представляет собой водный электрофоретический буфер для образца, содержащий от 0,5 до 1,5% додецилсульфата лития, от 65 до 95 мМ фосфата натрия и восстанавливающий агент, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН выше 8. В предпочтительном варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 9.

Восстанавливающие агенты известны в данной области техники. Иллюстративные восстанавливающие агенты включают, но не ограничиваются ими, дитиотреитол (ДТТ, CAS 3483-12-3), бета-меркаптоэтанол (BME, 2BME, 2-ME, b-mer, CAS 60-24-2), 2-аминоэтантол (2-MEA-HCl, также называемый цистеамин-HCl, CAS 156-57-0), Трис (2-карбокситил)фосфина гидрохлорид, (TCPEP, CAS 5961-85-3), цистеина гидрохлорид (Cys-HCl, CAS 52-89-1) или натриевую соль 2-меркаптоэтансульфоновой кислоты (MESNA). В данной области техники известны другие способы восстановления связей в белках, такие, как колонка с закрепленным восстановителем, которая содержит смолу, на которой закреплен восстанавливающий агент на основе тиола, чтобы сделать возможным твердофазное восстановление дисульфидных связей в пептидах и белках. Также подразумеваются ослабляющие агенты, в том числе окисляющие агенты, которые пригодны для уменьшения химического взаимодействия между полипептидами.

В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер содержит от 135 до 155 мМ дитиотреитола.

В еще одном варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий буфер, содержащий 0,69% додецилсульфата лития, 69 мМ фосфата натрия и 142 мМ дитиотреитола.

3. Невосстанавливающие буферы на основе HEPES.

Буферы на основе HEPES также можно использовать в раскрытых способах. В одном варианте осуществления изобретения предложен водный электрофоретический буфер для образца на основе HEPES, содержащий алкилирующий агент, например от 55 до 75 мМ 2-йодацетамида; от 0,1 до 1,0% додецилсульфата лития; от 5 до 85 мМ HEPES; и от 5 до 115 мМ хлорида натрия, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 9. В предпочтительном варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 8. В другом варианте осуществления изобретения водный буфер содержит 66,4 мМ 2-йодацетамида, 0,32% додецилсульфата лития, 16,2 мМ HEPES и 48,6 мМ хлорида натрия.

4. Восстанавливающие буферы на основе HEPES.

В другом варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий водный электрофоретический буфер для образца на основе HEPES, содержащий от 0,05 до 0,75% додецилсульфата лития, от 5 мМ до 115 мМ хлорида натрия, от 5 мМ до 115 мМ HEPES и восстанавливающий агент, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН выше 7. В предпочтительном варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 8. В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер содержит от 35 до 50 мМ дитиотреитола. В еще одном варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий буфер, содержащий 0,28% додецилсульфата лития, 41,5 мМ хлорида натрия, 13,8 мМ HEPES и 42,5 мМ дитиотреитола.

В. Анализы 1.

Анализы в невосстанавливающих условиях.

В одном варианте осуществления изобретения предложен способ невосстанавливающего МСЕ для выявления загрязнений или примесей в образце белкового лекарственного средства, причем способ включает стадии добавления образца белка к невосстанавливающему буферу, обсуждаемому выше, с образованием забуференного образца белкового лекарственного средства. Забуференный образец белкового лекарственного средства нагревают до от 65 до 85°C в течение от 5 до 15 мин с образованием денатурированного забуференного образца белкового лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления изобретения забуференный образец белкового лекарственного средства нагревают до 70°C в течение 10 мин. Затем к денатурированному забуференному образцу белкового лекарственного средства добавляют обнаружимую метку и нагревают при от 30 до 40°C в течение от 20 до 40 мин с образованием денатурированного образца меченого белкового лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления изобретения денатурированный образец белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают до 35°C в течение 30 мин. Избыток метки необязательно удаляют из

образца, например с использованием центробежного фильтра.

Предпочтительная обнаруживаемая метка включает, но не ограничивается ими, сложный эфир NHS Dyuomics DY-631. Другие обнаруживаемые метки, которые можно использовать, включают другие красители, флюорофоры, хромофоры, масс-спектрометрические метки, квантовые точки и тому подобное и те, которые описаны в патенте США № 6924372, который включен посредством ссылки в полном объеме.

Денатурированный меченый белковый фармацевтический продукт разбавляют и подвергают МСЕ для разделения разбавленного образца белкового лекарственного средства в системе микроципового капиллярного электрофореза, чтобы получить электрофореграмму. В одном варианте осуществления изобретения конечная концентрация образца, исходная концентрация которого 0,5 мг/мл, который затем вводят в микрочип, составляет 9 мкг/мл при МСЕ. В другом варианте осуществления изобретения исходная концентрация образца составляет 0,2 мг/мл. Электрофореграмма содержит пики, соответствующие белковому фармацевтическому продукту и примесям. Способ завершается идентификацией пиков на электрофореграмме, соответствующих загрязнениям или примесям.

2. Анализы в восстанавливающих условиях.

В другом варианте осуществления изобретения предложен способ восстанавливающего МСЕ для идентификации загрязнений или примесей в образце белкового лекарственного средства. Способ начинается с добавления образца белкового лекарственного средства к любому из восстанавливающих буферов, описанных выше, для получения забуференного образца белкового лекарственного средства. Забуференный образец белкового лекарственного средства денатурируют нагреванием забуференного образца лекарственного средства до от 65 до 85°C, предпочтительно до 70°C, в течение 10 мин с образованием денатурированного образца белкового лекарственного средства. Образец белкового лекарственного средства с добавленной меткой затем нагревают при от 30 до 40°C в течение от 20 до 40 мин с образованием денатурированного меченого образца белкового лекарственного средства. В предпочтительном варианте осуществления изобретения образец белкового фармацевтического продукта с добавленной меткой нагревают до 35°C в течение 30 мин. Избыток метки необязательно удаляют из образца, например с использованием центробежного фильтра. Предпочтительная обнаруживаемая метка включает, но не ограничивается ими, сложный эфир NHS Dyuomics DY-631. Другие обнаруживаемые метки, которые можно использовать, включают другие красители, флюорофоры, хромофоры, масс-спектрометрические метки, квантовые точки и тому подобное и те, которые описаны в патенте США № 6924372, который включен посредством ссылки в полном объеме.

В одном варианте осуществления изобретения установленный диапазон концентраций образца для анализа составляет от 0,4 мг/мл до 0,6 мг/мл, что соответствует конечной анализируемой концентрации от около 7 мкг/мл до 11 мкг/мл, которую подвергают МСЕ анализу в системе для микроципового капиллярного электрофореза с получением электрофореграммы. Способ завершается идентификацией пиков на электрофореграмме, соответствующих загрязнениям или примесям.

С. Оборудование.

Оборудование для проведения раскрытых МСЕ анализов является коммерчески доступным. В предпочтительном варианте осуществления изобретения раскрытые МСЕ анализы выполняют с использованием LabChip GXII или LabChip GXII Touch HT и экспресс-чип-анализатора для анализа белков LabChip® HT.

III. Представляющие интерес белки.

Представляющий интерес белок, например белковый фармацевтический продукт, который подвергают анализу с использованием раскрытых способов анализа и реагентов для МСЕ, может представлять собой любой представляющий интерес белок, пригодный для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках, и может использоваться в представленных разработанных системах клетки-хозяина. Например, представляющий интерес белок включает, но не ограничивается этим, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, белок слияния Fc или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент. Представляющие интерес белки могут представлять собой простые полипептиды, состоящие из единственной субъединицы, или сложные мультисубъединичные белки, содержащие две или более субъединиц. Представляющий интерес белок может представлять собой биофармацевтический продукт, пищевую добавку или консервант, или любой белковый продукт, подлежащий очистке и установлению стандартов качества.

В некоторых вариантах осуществления изобретения белковый фармацевтический продукт (представляющий интерес белок) представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')₂, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет

собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело выбрано из группы, состоящей из антитела против программируемой клеточной гибели 1 (например, антитело против PD1, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0203579A1), антитела против лиганда программируемой клеточной гибели 1 (например, антитело против PD-L1, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0203580A1), антитела против D114, антитела против ангиопоэтина-2 (например, антитело против ANG2, как описано в патенте США № 9402898), антитела против ангиопоэтинподобного белка-3 (например, антитело против AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела против рецептора фактора роста тромбоцитов (например, антитело против PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела против Erb3, антитела против рецептора пролактина (например, антитело против PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела против компонента 5 (например, антитело против C5, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0313194A1), антитела против ФНО, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, антитело против EGFR, как описано в патенте США № 9132192 или антитело против EGFRvIII, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0259423A1), антитела против пропротеинконвертазы субтилизинкксин-9 (например, антитело против PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или патенте США № 9540449), антитела против фактора роста и дифференцировки-8 (например, антитело против GDF8, также известное как антитело против миостатина, как описано в патентах США № 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагона (например, антитело против GCGR, как описано в публикациях патентных заявок США № US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), антитела против ФРЭС, антитела против IL1R, антитела против рецептора интерлейкина 4 (например, антитело против IL4R, как описано в публикации патентной заявки США № US2014/0271681A1 или патентах США № 8735095 или 8945559), антитело против рецептора интерлейкина 6 (например, антитело против IL6R, как описано в патентах США № 7582298, 8043617 или 9173880), антитела против ИЛ1, антитела против ИЛ2, антитела против ИЛ3, антитела против ИЛ4, антитела против ИЛ5, антитела против ИЛ6, антитела против ИЛ7, антитела против интерлейкина 33 (например, антитело против ИЛ33, как описано в патентах США № 9453072 или 9637535), антитела против респираторно-синцитиального вируса (например, антитело против RSV, как описано в публикации патентной заявки США № 9447173), антитела против белка кластера дифференцировки 3 (например, антитело против CD3, как описано в патентах США № 9447173 и 9447173 и в заявке США № 62/222605), антитела против белка кластера дифференцировки 20 (например, антитело против CD20, как описано в патентах США № 9657102 и US20150266966A1 и в патенте США № 7879984), антитела против CD19, антитела против CD28, антитела против белка кластера дифференцировки 48 (например, антитело против CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела против Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела против вируса ближневосточного респираторного синдрома (например, антитело против MERS, как описано в публикации патентной заявки США № US2015/0337029A1), антитела против вируса Эболы (например, как описано в публикации патентной заявки США № US2016/0215040), антитела против вируса Зика, антитела против гена активации лимфоцитов 3 (например, антитело против LAG3 или антитело против CD223), антитела против фактора роста нервов (например, антитело против NGF, как описано в публикации патентной заявки США № US2016/0017029 и патентах США № 8309088 и 9353176) и антитела против белка Y. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела против CD3 и CD20 (как описано в публикациях патентных заявок США № US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела против CD3 и мюдина 16 (например, биспецифическое антитело против CD3 и Muc16) и биспецифического антитела против CD3 и простатспецифического мембранного антигена (например, биспецифическое антитело против CD3 и PSMA). В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-atto, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлотоксумаба, блинатумумаба, брентуксимабаведонтина, бродалумаба, канакиумаба, капромабапендетида, цертолизумабапегола, цемиплиумаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтазина, алирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фасинумаба, голимумаба, гуселкумаба, ибритумумабатиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-abda, инфликсимаба-duyb, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит фрагмент Fc и другой домен (например, белок слияния с Fc). В некоторых вариантах осуществления изобретения белок слияния с Fc представляет собой рецеп-

торный белок слияния с Fc, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, связанного с фрагментом Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент Fc содержит шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецепторный белок слияния с Fc содержит две или более отдельных цепей рецептора, которые связаны или с единственным лигандом, или с несколькими лигандами. Например, белок слияния с Fc представляет собой белок-ловушку, такую как, например, ловушку ИЛ-1 (например, рилонацепт, который содержит лиганд-связывающую область IL-1RAcP, связанную с внеклеточной областью IL-1R1, связанной с Fc из hIgG1; см. патент США № 6927004, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме), или ловушку ФРЭС (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора ФРЭС Flt1, связанный с Ig-доменом 3 рецептора ФРЭС Flk1, связанным с Fc из hIgG1; см. патенты США № 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления изобретения белок слияния с Fc представляет собой белок слияния ScFv-Fc, который содержит один или более из одного или более антиген-связывающих доменов, таких как вариабельный фрагмент тяжелой цепи и вариабельный фрагмент легкой цепи, антитела, связанного с фрагментом Fc.

IV. Клеточная культура.

Белковый фармацевтический продукт, который анализируют с помощью раскрытых способов анализа и реагентов для МСЕ, получают с помощью клеточных культур. Клеточные культуры могут представлять собой "стационарную клеточную культуру с подпиткой" или "стационарную культуру с подпиткой", которая относится к стационарной культуре, в которой клетки и среду для культивирования подают в сосуд для культивирования изначально, а дополнительные питательные вещества для культивирования медленно добавляют, отдельными порциями, в культуру при культивировании, с периодическим сбором клеток и/или продукта до завершения культивирования или без него. Стационарная клеточная культура с подпиткой включает "полунепрерывную стационарную клеточную культуру с подпиткой", когда периодически всю культуру (которая может включать клетки и среду) удаляют и заменяют свежей средой. Стационарная культура с подпиткой отличается от просто "стационарной культуры", когда все компоненты для культивирования клеток (в том числе клетки животных и все питательные компоненты культуры) подают в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования в стационарной культуре. Стационарная культура с подпиткой может отличаться от "проточной культуры" в том смысле, что надсадочную жидкость не удаляют из сосуда для культивирования в стандартном стационарном процессе с подпиткой, тогда как при проточном культивировании клетки задерживаются в культуре, например, с помощью фильтрации, и среду для культивирования непрерывно или периодически вводят и удаляют из сосуда для культивирования. Однако при стационарном культивировании с подпиткой подразумевается отбор образцов для исследовательских целей. Стационарный процесс с подпиткой продолжается до того, как будет определено, что достигнут максимальный рабочий объем и/или выработка белка, и затем белок собирают.

Клеточная культура может представлять собой "непрерывную клеточную культуру", которая представляет собой технологию, используемую для непрерывного роста клеток, обычно в конкретной фазе роста. Например, если требуется постоянная подача клеток, или требуется получение конкретного представляющего интерес белка, клеточную культуру необходимо поддерживать в конкретной фазе роста. Таким образом, условия необходимо непрерывно контролировать и регулировать соответствующим образом, чтобы поддерживать клетки в указанной конкретной фазе.

Клетки культивируют в среде для культивирования клеток. Термины "среда для культивирования клеток" и "среда для культивирования" относятся к питательному раствору, используемому для выращивания клеток млекопитающих, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как углеводный источник энергии, незаменимые (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и заменимые (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин) аминокислоты, микроэлементы, источники энергии, липиды, витамины и т.д. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые поставляют исходные вещества, которые поддерживают рост клеток. Среда может содержать полученные из дрожжей или соевые экстракты вместо экстрактов животного происхождения. Химически определенная среда относится к среде для культивирования клеток, в которой известны все химические компоненты (т.е. имеет известную химическую структуру). Химически определенная среда вообще не содержит компонентов животного происхождения, таких как пептоны из сыворотки или животного происхождения. В одном варианте осуществления изобретения среда представляет собой химически определенную среду.

Раствор также может содержать компоненты, которые усиливают рост и/или выживаемость выше минимального уровня, в том числе гормоны и факторы роста. Раствор может быть составлен с рН и концентрацией соли, оптимальными для выживания и пролиферации конкретной клетки, подлежащей культивированию.

"Клеточная линия" относится к клетке или клеткам, которые получены из конкретной линии посредством последовательного пассирования или пересевания клеток. Термин "клетка" используется вза-

имозаменяемо с "клеточной популяцией".

Термин "клетка" включает любую клетку, которая пригодна для экспрессирования рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот, такие как бактериальные клетки, клетки млекопитающих, человеческие клетки, не относящиеся к человеку клетки животных, клетки птиц, клетки насекомых, дрожжевые клетки или клеточные слияния, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления изобретения клетка выбрана из следующих клеток: клетки яичников китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки глаза, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, например Jurkat (Т-лимфоцит) или Daudi (В-лимфоцит), A431 (эпидермальная), U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-O, клетки ММТ, стволовой клетки, опухолевой клетки и клеточной линии, полученной из вышеупомянутой клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка содержит один или более вирусных генов, например клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6®). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления изобретения клетка представляет собой клетку CHO K1.

V. Наборы.

В одном варианте осуществления изобретения предложен набор, содержащий один или более раскрытых буферов или ингредиентов для получения раскрытых буферов. Набор может содержать емкость для буферов или ингредиентов. Буфер может быть в форме раствора или в лиофилизированной форме. Набор необязательно также содержит вторую емкость, содержащую разбавитель или восстанавливающий раствор для лиофилизованного состава; и необязательно инструкции по применению раствора или восстановленного раствора и/или применению лиофилизированных буферов или порошковых ингредиентов.

Набор может дополнительно содержать дополнительные реагенты, необходимые для осуществления раскрытых способов МСЕ анализа, в том числе один или более буферных агентов, разбавителей и фильтров. Буфер и реагенты могут находиться в бутылке, флаконе или пробирке.

Пример

Пример 1: МСЕ анализ для определения чистоты и примесей лечебных белков.

Методики и материалы:

Материалы:

LabChip GXII или LabChip GXII Touch HT и экспресс-чип-анализатор белков LabChip® HT использовали для капиллярного электрофоретического разделения и сбора данных (PerkinElmer). Для МСЕ анализа использовали невосстанавливающие и восстанавливающие денатурирующие буферы, описанные выше.

Методики:

Таблица 1 демонстрирует последовательность действий для получения образца для МСЕ анализа. Вкратце, образцы белка разбавляли до 0,5 мг/мл. 1 мкл невосстанавливающего (NR) или восстанавливающего (R) денатурирующего буфера и 4 мкл разбавленного образца добавляли в 96-луночный планшет. Образец перемешивали, центрифугировали и нагревали в течение 10 мин при температуре, указанной для продукта, обычно 75°C. Образцы затем метили с помощью 5 мкМ коммерчески доступного красителя (например, сложного эфира NHS Dyomics DY-631). Образцы перемешивали, центрифугировали, а затем нагревали при 35°C в течение 30 мин. Меченый образец затем разбавляли 105 мкл разбавленного стоп-раствора. Образцы разделяли с использованием LabChip GXII или LabChip GXII Touch HT.

Буферы.

Готовили исходные растворы 200 мМ моногидрата одноосновного фосфата натрия, 200 мМ гептагидрата двухосновного фосфата натрия и 10% додецилсульфата лития (ДСЛ). Используя исходные растворы и воду Milli-Q®, готовили растворы 100 мМ фосфата натрия, 1% ДСЛ, pH 6 и 100 мМ фосфата натрия, 1% ДСЛ, pH 9.

Невосстанавливающий буфер готовили путем добавления 34 мкл 1 М йодацетамида (IAM) (приготовлен свежим в воде Milli-Q®)+166 мкл 100 мМ фосфата натрия, 1% ДСЛ, pH 6+5 мкл воды Milli-Q®. Конечные концентрации составляли 166 мМ 2-йодацетамида, 0,81% додецилсульфата лития и 81 мМ фосфата натрия.

Восстанавливающий буфер готовили путем добавления 68 мкл 10× восстанавливающего агента (500 мМ дитиотреитола (ДТТ))+166 мкл 100 мМ фосфата натрия, 1% ДСЛ, pH 9+6 мкл воды Milli-Q®). Конечные концентрации составляли 0,69% додецилсульфата лития; 69 мМ фосфата натрия и 142 мМ дитиотреитола.

Методика подготовки образца для МСЕ анализа

Подготовка образца	
NR	R
4 мкл 0,5 мг/мл образца 1 мкл NR буфера	4 мкл 0,5 мг/мл образца 1 мкл R буфера
Перемешать, отцентрифугировать, нагреть при указанной температуре в течение 10 минут	
Мечение образца	
5 мкл денатурированного образца	
5 мкл 5 мкМ красителя PICO	
Перемешать, отцентрифугировать, нагреть при 35°C в течение 30 минут	
Конечное разбавление	
5 мкл меченого образца	
105 мкл разбавленного стоп-раствора	
Методика разделения	
Экспресс-анализ белков HT PICO 200	

Результаты:

Микрочиповый капиллярный электрофорез (МСЕ) позволяет существенно снизить время анализа образцов, при этом сохраняя стандарты производительности и воспроизводимости, требуемые для анализа КК. Способ МСЕ анализа был разработан с использованием невосстанавливающего и восстанавливающего денатурирующих буферов, раскрытых в данном документе. Фиг. 1А-1В иллюстрируют типичную электрофореграмму, демонстрирующую анализ белка в невосстановленных образцах и восстановленных образцах.

Хотя вышеприведенное описание данного изобретения представлено в связи с конкретными его вариантами осуществления, и с целью иллюстрации было приведено много подробностей, специалистам в данной области техники очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты осуществления, и что некоторые из подробностей, описанных в данном документе, могут в значительной степени изменяться без отклонения от основных принципов изобретения.

Все источники, процитированные в данном документе, включены в полном объеме посредством ссылки. Данное изобретение может охватывать другие конкретные формы без отклонения от его сущности или существенных черт, и соответственно руководствоваться следует прилагаемой формулой изобретения, а не вышеприведенным описанием, как определяющей объем изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водный электрофоретический буфер для образца белкового лекарственного средства, содержащий: от 155 до 175 мМ 2-йодацетамида; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 75 до 95 мМ фосфата натрия, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 7.
2. Водный электрофоретический буфер для образца по п.1, отличающийся тем, что рН составляет 6.
3. Водный электрофоретический буфер для образца по п.1 или 2, содержащий 166 мМ 2-йодацетамида, 0,81% додецилсульфата лития и 81 мМ фосфата натрия.
4. Водный электрофоретический буфер для образца белкового лекарственного средства, состоящий из: 166 мМ 2-йодацетамида, 0,81% додецилсульфата лития и 81 мМ фосфата натрия, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН 6,0.
5. Способ выявления загрязнений или примесей в образце белкового лекарственного средства, причем способ включает стадии:
 - добавления образца белкового лекарственного средства к водному электрофоретическому буферу, содержащему:
 - от 155 до 175 мМ 2-йодацетамида;
 - от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и
 - от 75 до 95 мМ фосфата натрия,
 причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 7, с получением забуференного образца белкового лекарственного средства;
 - нагревания забуференного образца белкового лекарственного средства до от 65 до 85°C в течение от 5 до 15 мин с образованием денатурированного забуференного образца белкового лекарственного средства;

добавления обнаруживаемой метки к денатурированному забуференному образцу белкового лекарственного средства и нагревания его при от 30 до 40°C в течение от 20 до 40 мин с образованием денатурированного меченого образца белкового лекарственного средства;

разбавления денатурированного меченого образца белкового лекарственного средства и подвергания его микрочиповому капиллярному электрофорезу (МСЕ) для разделения разбавленного денатурированного меченого образца белкового лекарственного средства в системе микрочипового капиллярного электрофореза, чтобы получить электрофореграмму; и

идентификации пиков на электрофореграмме, соответствующих загрязнениям или примесям.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что забуференный образец белкового лекарственного средства нагревают при 70°C в течение 10 мин.

7. Способ по п.5 или 6, отличающийся тем, что меченый образец белкового лекарственного средства нагревают при 35°C в течение 30 мин.

8. Способ по любому из пп.5-7, отличающийся тем, что разбавленный образец белкового лекарственного средства имеет концентрацию 9 мкг/мл.

9. Способ выявления загрязнений или примесей в образце белкового лекарственного средства, причем способ включает стадии:

добавления образца белка к водному электрофоретическому буферу, содержащему:

от 155 до 175 мМ 2-йодацетамида; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и

от 75 до 95 мМ фосфата натрия,

причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 7,

с получением забуференного образца белкового лекарственного средства;

нагревания забуференного образца белкового лекарственного средства до от 65 до 85°C в течение от 5 до 15 мин с образованием денатурированного забуференного образца белкового лекарственного средства;

добавления обнаруживаемой метки к денатурированному образцу белкового лекарственного средства и нагревания его при от 30 до 40°C в течение от 20 до 40 мин с образованием денатурированного меченого образца белкового лекарственного средства;

разбавления денатурированного меченого образца белкового лекарственного средства и подвергания его микрочиповому капиллярному электрофорезу (МСЕ) для разделения разбавленного денатурированного меченого образца белкового лекарственного средства в системе микрочипового капиллярного электрофореза, чтобы получить электрофореграмму; и

идентификации пиков на электрофореграмме, соответствующих загрязнениям или примесям.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что забуференный образец белкового лекарственного средства нагревают при 70°C в течение 10 мин.

11. Способ по п.9 или 10, отличающийся тем, что денатурированный образец белкового лекарственного средства нагревают при 35°C в течение 30 мин.

12. Способ по любому из пп.9-11, отличающийся тем, что разбавленный образец белкового лекарственного средства имеет концентрацию 9 мкг/мл.

13. Способ по любому из пп.5-12, отличающийся тем, что обнаруживаемая метка представляет собой N-гидроксисукцинимидиловый сложный эфир DY-631.

14. Набор для микрочипового капиллярного электрофореза (МСЕ), содержащий водный электрофоретический буфер для образца белкового лекарственного средства, содержащий от 155 до 175 мМ 2-йодацетамида; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 75 до 95 мМ фосфата натрия, причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 7, и письменные инструкции для получения образца для микрочипового капиллярного электрофореза в водном электрофоретическом буфере для выявления загрязнений или примесей.

15. Водный электрофоретический буфер для образца белкового лекарственного средства, содержащий:

от 55 до 75 мМ 2-йодацетамида;

от 0,1 до 1,0% додецилсульфата лития;

от 5 до 115 мМ хлорида натрия и

от 5 до 85 мМ HEPES,

причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 9.

16. Водный электрофоретический буфер для образца белкового лекарственного средства, содержащий:

66,4 мМ 2-йодацетамида;

0,32% додецилсульфата лития;

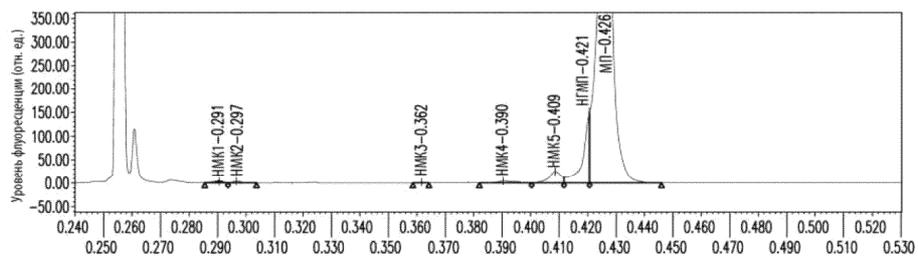
48,6 мМ NaCl и

16,2 мМ HEPES,

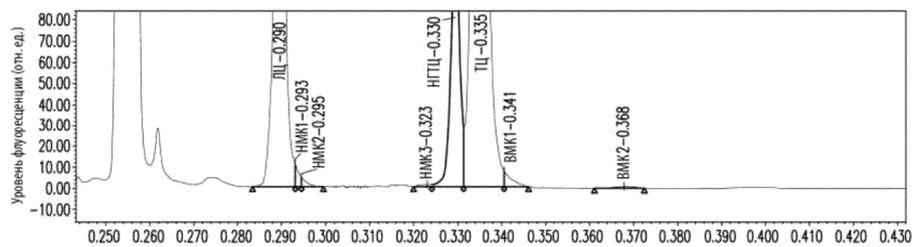
причем водный электрофоретический буфер для образца имеет рН менее 9.

17. Водный буфер по п.15 или 16, отличающийся тем, что рН составляет 8.

045662



Фиг. 1А



Фиг. 1В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2