

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047877**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.09.25

(51) Int. Cl. **G01N 33/68 (2006.01)**
G01N 27/447 (2006.01)

(21) Номер заявки
202390449

(22) Дата подачи заявки
2021.08.28

(54) **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК АДЕНОАССОЦИИРОВАННОГО ВИРУСА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА МИКРОЧИПЕ**

(31) **63/071,815**

(32) **2020.08.28**

(33) **US**

(43) **2023.04.17**

(86) **PCT/US2021/048116**

(87) **WO 2022/047269 2022.03.03**

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

(72) Изобретатель:
**Цзян Бауэн, Тзул Франко, Лю
Динцзян (US)**

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

(56) WEISS ET AL. "Virus analysis by electrophoresis on a microfluidic chip", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 860, no. 2, 19 November 2007 (2007-11-19), pages 173-179, XP022371223, ISSN: 1570-0232, DOI: 10.1016/J.JCHROMB.2007.10.026 page 174, column 2, paragraph 4 page 175, column 1, paragraph 4 - paragraph 5 page 175, column 2, paragraph 3; figure 1
Tanigawa K. ET AL. "ON-LINE PRECONCENTRATION USING DENATURATION

OF PROTEINS ON A HEATER INTEGRATED ELECTROPHORESIS MICROCHIP", 1 January 2010 (2010-01-01), XP055859578, Retrieved from the Internet: URL:https://www.rsc.org/binaries/L0C/2010/PDFs/Papers/355_0266.pdf, [retrieved on 2021-11-09], the whole document

XIAOYING JIN ET AL. "Direct Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis for Complete Characterization of Recombinant Adeno-Associated Virus Capsid Proteins", HUMAN GENE THERAPY METHODS, 16 June 2017 (2017-06-16), XP055416361, ISSN: 1946-6536, DOI: 10.1089/hgtb.2016.178, cited in the application, abstract, page 11, column 2, paragraph 1

SCHULER B. ET AL. "Specific labeling of polypeptides at ami no-terminal cysteine residues using Cy5-benzyl thioester", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 13, no. 5, 18 July 2002 (2002-07-18), pages 1039-1043, XP002259205, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC025509T, abstract

WO-A1-2005033687

HENRY CHARLES S. "Microchip capillary electrophoresis - An introduction", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY HUMANA PRESS INC, 999 RIVERVIEW DR, STE 208, TOTOWA, NJ 07512-1165 USA SERIES: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (ISSN 1064-3745(PRINT)), 2006, pages 1-9, XP009531190, cited in the application, the whole document

(57) Предложены способы и системы для идентификации капсидных вирусных белков в образце, содержащем вирусные векторы, включающие определение соотношения капсидных вирусных белков аденоассоциированного вируса. Указанные способы и системы включают денатурирование капсидных вирусных белков в образце, мечение денатурированных капсидных вирусных белков красителем для конъюгации по лизину, получение профиля разделения денатурированных/меченых капсидных вирусных белков с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе, количественное определение уровней капсидных вирусных белков исходя из профиля разделения, определение количественного соотношения капсидных вирусных белков исходя из профиля разделения и нормализацию количественного соотношения исходя из содержания лизина в капсидных вирусных белках.

047877 B1

047877 B1

Перекрестная ссылка на родственную заявку

Настоящая заявка заявляет приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/071,815, поданной 28 августа 2020 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Область техники

Изобретение в целом относится к способам и системам для определения характеристик или количества капсидных белков аденоассоциированного вируса с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе в сочетании с флуоресцентным красителем.

Уровень техники

Биологические препараты для генной терапии опосредуют терапевтические эффекты за счет транскрипции и/или трансляции переносимого генетического материала, как, например, при интеграции генетического материала в геном хозяина. Биологические препараты для генной терапии включают нуклеиновые кислоты, плазмиды, вирусы, векторы или полученные с помощью методов генной инженерии микроорганизмы. Аденоассоциированные вирусы (AAV) широко используются в качестве векторов для генной доставки генетического материала при генной терапии. Хотя AAV не интегрируются в геном хозяина, AAV могут обеспечивать долгосрочную экспрессию генов в неделящихся клетках.

В процессе изготовления биологических препаратов оценка продукта включает оценку используемых при изготовлении компонентов, тестирование/определение характеристик конечных продуктов и оценку контроля производственных процессов для обеспечения безопасности и качества продукта. Конечный продукт должен быть протестирован и охарактеризован в отношении чистоты, идентификационных характеристик и эффективности. Таким образом, тесты продукта в случае AAV могут включать тестирование в отношении соотношения инфекционных и неинфекционных векторов, наличия пустых капсидов или стехиометрических соотношений вирусных белков. Определение характеристик капсидных белков AAV является крайне важным для обеспечения качества продукта и единообразия AAV от партии к партии, поскольку сборка вирусных капсидных белков AAV может оказывать существенное влияние на инфицирующую способность, эффективность и стабильность AAV.

Понятно, что существует потребность в способах и системах для идентификации и определения характеристик капсидных вирусных белков AAV. Определение характеристик капсидных вирусных белков AAV должно включать определение соотношений разных капсидных вирусных белков, поскольку правильное соотношение капсидных вирусных белков может быть крайне важным для биологических функций AAV (в частности, структуры капсида наряду с различиями в аминокислотах, которые опосредуют тропизмы к тканям). Эти способы и системы должны обеспечивать хорошо отлаженное, быстрое, надежное, чувствительное и высокопроизводительное обнаружение и определение характеристик капсидных вирусных белков AAV.

Сущность изобретения

Данная заявка относится к способам и системам для идентификации и/или определения характеристик капсидных вирусных белков в образце, содержащем вирусные векторы. Эти способы и системы относятся к быстрым, надежным, чувствительным и высокопроизводительным процессам для идентификации капсидных вирусных белков, включая определение соотношений разных капсидных вирусных белков AAV.

Данное описание относится к способу определения количественного соотношения двух или более белков в образце, содержащем вирусные векторы. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения данное описание относится к способу, включающему: денатурирование двух или более белков в образце в растворе для денатурации при температуре по меньшей мере около 60°C; мечение денатурированных двух или более белков красителем для конъюгации по лизину; получение профиля разделения денатурированных/меченых двух или более белков с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе; количественное определение уровней двух или более белков исходя из профиля разделения; и сравнение количественно определенных уровней двух или более белков с целью определения количественного соотношения указанных двух или более белков.

В одном аспекте способ по данной заявке дополнительно включает нормализацию количественного соотношения исходя из содержания лизина в двух или более белках. В одном аспекте способ по данной заявке дополнительно включает корректирование количественного соотношения исходя из времени миграции согласно профилю разделения. В одном аспекте краситель для конъюгации по лизину согласно способу по данной заявке представляет собой аминсвязывающий флуоресцентный краситель. В другом аспекте краситель для конъюгации по лизину согласно способу по данной заявке содержит активный сложный эфир, изотиоцианат или сульфонилхлорид. Еще в одном аспекте краситель для конъюгации по лизину согласно способу по данной заявке содержит активный сложный эфир, причем активный сложный эфир включает сукцинимидиловый сложный эфир, сульфосукцинимидиловый сложный эфир, тетрафторфениловый сложный эфир или сульфодихлорфеноловый сложный эфир.

В одном аспекте вирусный вектор согласно способу по данной заявке представляет собой AAV. В одном аспекте вирусный вектор согласно способу по данной заявке содержит вирусный белок 1 (VP1), вирусный белок 2 (VP2) и вирусный белок 3 (VP3). В другом аспекте раствор для денатурации согласно

способу по данной заявке содержит детергент, причем детергент представляет собой додецилсульфат лития (LDS) или додецилсульфат натрия (SDS).

Данное описание, по меньшей мере частично, относится к системе для определения количественного соотношения двух или более белков в образце, содержащем по меньшей мере один вирусный вектор. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения данное описание относится к системе, содержащей: микропланшет для приема образца, содержащего по меньшей мере один вирусный вектор, раствора для денатурации, способного к денатурации двух или более белков в указанном образце при температуре по меньшей мере около 60°C, и красителя для конъюгации по лизину, способного к мечению двух или более белков; и устройство для капиллярного электрофореза на микрочипе, способное к приему указанного микроплшета, разделению денатурированных/меченых двух или более белков с получением профиля разделения, количественному определению уровней двух или более белков и сравнению количественно определенных уровней двух или более белков с целью определения количественного соотношения двух или более белков.

В одном аспекте количественное соотношение может быть нормализовано исходя из содержания лизина в двух или более белках. В одном аспекте количественное соотношение может быть скорректировано исходя из времени миграции согласно профилю разделения. В другом аспекте краситель для конъюгации по лизину из системы по данной заявке представляет собой аминсвязывающий флуоресцентный краситель. В одном аспекте краситель для конъюгации по лизину из системы по данной заявке содержит активный сложный эфир, изотиоцианат или сульфонилхлорид. Еще в одном аспекте краситель для конъюгации по лизину из системы по данной заявке содержит активный сложный эфир, причем активный сложный эфир включает сукцинимидиловый сложный эфир, сульфосукцинимидиловый сложный эфир, тетрафторфениловый сложный эфир или сульфодихлорфеноловый сложный эфир.

В одном аспекте вирусный вектор из системы по данной заявке представляет собой AAV. В одном аспекте вирусный вектор из системы по данной заявке содержит VP1, VP2 и VP3. В другом аспекте раствор для денатурации из системы по данной заявке содержит детергент, причем детергент представляет собой LDS или SDS.

Эти и другие аспекты данного изобретения будут более очевидны и понятны при рассмотрении в сочетании с нижеследующим описанием и прилагаемыми чертежами. Нижеследующее описание, несмотря на упоминание различных вариантов реализации изобретения и их конкретных многочисленных деталей, приводится в качестве иллюстрации, а не ограничения. В пределах объема данного изобретения можно выполнять множественные замены, модификации, добавления или перестановки.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показана структура AAV1, включая кристаллическую структуру мономера VP3 капсида AAV1 и представление поверхности капсида AAV1 согласно Venkatakrishnan et al., Structure and Dynamics of Adeno-Associated Virus Serotype 1 VP1-Unique N-Terminal Domain and Its Role in Capsid Trafficking, Journal of Virology, May, 2013, vol. 87, no. 9, страницы 4974-4984.

На фиг. 2 показаны результаты разделения капсидных вирусных белков AAV с использованием традиционных способов, таких как SDS-PAGE и обращенно-фазовая жидкостная хроматография, согласно Jin et al., Direct liquid chromatography/mass spectrometry analysis for complete characterization of recombinant adeno-associated virus capsid proteins, Human gene therapy methods, 2017, Vol. 28, No. 5, страницы 255-267.

На фиг. 3 показан процесс подготовки образца для мечения белков красителями для конъюгации по лизину в восстанавливающих условиях согласно типовому варианту реализации изобретения.

На фиг. 4 показан процесс подготовки образца для мечения белков красителями для конъюгации по лизину в невозстанавливающих условиях согласно типовому варианту реализации изобретения.

На фиг. 5 показан набор маркеров Pico Protein Express, содержащий шесть стандартных белков с молекулярной массой 15,9 кДа (LA1), 20,4 кДа (LA2), 28,9 кДа (LA3), 48,4 кДа (LA4), 68,4 кДа (LA5) или 119,2 кДа (LA6) согласно типовому варианту реализации изобретения.

На фиг. 6А показаны результаты разделения капсидных вирусных белков AAV8, таких как VP1, VP2 и VP3, с использованием капиллярного электрофореза в сочетании с окрашиванием гидрофобным красителем согласно типовому варианту реализации изобретения.

На фиг. 6В показаны результаты определения соотношения капсидных вирусных белков AAV8, как, например, соотношения VP1:VP2:VP3, с использованием капиллярного электрофореза в сочетании с окрашиванием гидрофобным красителем согласно типовому варианту реализации изобретения. Двенадцать электрофореграмм были наложены для демонстрации воспроизводимости анализа.

На фиг. 7 показаны результаты разделения меченых капсидных вирусных белков AAV8 с использованием капиллярного электрофореза в сочетании с красителями для конъюгации по лизину согласно типовому варианту реализации изобретения.

Подробное описание сущности изобретения

Аденоассоциированные вирусы (AAV) широко используются в качестве векторов для генной доставки генетического материала, как, например, для доставки нуклеиновых кислот при генной терапии. AAV обеспечивают преимущества, заключающиеся в отсутствии патогенности и низкой иммуногенно-

сти. AAV являются непатогенными членами рода Dependovirus семейства Parvoviridae, и для инфицирования им необходимы хелперные вирусы, такие как аденовирус или герпесвирус (Venkatakrishnan et al., Structure and Dynamics of Adeno-Associated Virus Serotype 1 VP1-Unique N-Terminal Domain and Its Role in Capsid Trafficking, *Journal of Virology*, May, 2013, vol. 87, no. 9, страницы 4974-4984). AAV инкапсулирует геном в виде однонитевой ДНК размером около 4,8 тысяч пар нуклеотидов (т. п. о.) в икосаэдрический капсид, который состоит из оболочки из белков, например, капсидных вирусных белков. На фиг. 1 показана структура AAV1, включая кристаллическую структуру мономера VP3 капсида AAV1 и представление поверхности капсида AAV1 с радиальной цветовой маркировкой (Venkatakrishnan et al.).

При мониторинге качества и эффективности AAV в качестве векторов для генной доставки крайне важным является мониторинг чистоты, идентификационных характеристик капсида, титра векторных частиц, соотношения пустой вектор/вектор со вставкой и соотношения капсидных вирусных белков. Капсидные вирусные белки самособираются с образованием внешней капсидной оболочки, которая активно вовлечена в связывание с клеткой и проникновение в клетку. Капсидные вирусные белки самособираются в конкретном стехиометрическом соотношении, которое является важным для структуры капсидной оболочки. Следовательно, существует насущная потребность в разработке способа, который является быстрым, надежным, чувствительным и высокопроизводительным, для определения соотношений капсидных вирусных белков для AAV, подлежащих использованию в качестве систем генной доставки. Определение характеристик капсидных белков AAV должно включать определение соотношений разных капсидных белков. Правильное соотношение капсидных вирусных белков является крайне важным для биологических функций AAV. Разрушение капсидных белков может негативно влиять на инфицирующую способность AAV. Капсиды должны быть способными защищать геном AAV до тех пор, пока не появится подходящая клетка-хозяин, не будет инициирован процесс проникновения в клетку и геном AAV не будет высвобожден для репликации.

Определение характеристик капсидных белков AAV является важным для обеспечения качества продукта и единообразия AAV, поскольку сборка вирусных капсидных белков AAV может оказывать существенное влияние на инфицирующую способность вируса и эффективность вектора (Jin et al., Direct liquid chromatography/mass spectrometry analysis for complete characterization of recombinant adeno-associated virus capsid proteins, *Human gene therapy methods*, 2017, Vol. 28, No. 5, страницы 255-267). Капсидные вирусные белки AAV могут играть роль в инициации как синтеза второй нити, когда ssDNA упакована, так и транскрипции вводимого генома (Salganik et al., Adeno-associated virus capsid proteins may play a role in transcription and second-strand synthesis of recombinant genomes, *Journal of Virology*, January 2014, Vol. 88, No. 2, страницы 1071-1079).

Геном AAV в виде однонитевой ДНК содержит три гена, включая гер (репликация), сар (капсид) и аар (сборка). Ген гер нужен для репликации и упаковки вирусного генома. Ген сар кодирует капсидные вирусные белки. В результате экспрессии гена сар продуцируются капсидные вирусные белки, включая VP1, VP2 и VP3, образующиеся в результате трансляции претерпевших альтернативный сплайсинг мРНК, с общими С-концами. VP3 имеет размер примерно 61 кДа, и он составляет около 85% капсидных белков. VP2 имеет размер примерно 73 кДа. VP1 имеет размер примерно 87 кДа. VP1 содержит уникальную область VP1 (VP1u), включающую домен фосфолипазы A2 и сигналы ядерной локализации. (Rayprolu et al., Comparative analysis of adeno-associated virus capsid stability and dynamics, *Journal of Virology*, December 2013, vol. 87, No. 24, p. 13150-13160). Капсид AAV состоит из 60 мономеров вирусных белков, включающих VP1, VP2 и VP3. VP3 является основным капсидным белком, и, следовательно, он играет ключевую роль в обеспечении стабильности капсидной оболочки. В капсиде AAV находится примерно 50 копий VP3. В капсиде AAV находится примерно 5 копий VP1 и 5 копий VP2. В целом, соотношение VP1:VP2:VP3 составляет около 1:1:10 в капсиде, содержащем 60 мономеров вирусных белков, например, 5 копий VP1, 5 копий VP2 и 50 копий VP3 (Venkatakrishnan et al.).

Капсидные вирусные белки AAV можно разделять исходя из различий в размере, используя SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия). Традиционные способы анализа для определения характеристик капсидных белков AAV включают SDS-PAGE-анализ и обращенно-фазовую жидкостную хроматографию (как показано на фиг. 2, согласно Jin et al.). Однако разделение с помощью SDS-PAGE характеризуется низкой производительностью и количественной изменчивостью. VP1, VP2 и VP3 могут быть визуализированы с использованием SDS-PAGE с окрашиванием серебряным красителем, что является трудоемким и длительным процессом с неудовлетворительными количественными данными. Проблемы, обуславливающие неудовлетворительные количественные данные SDS-PAGE в сочетании с окрашиванием серебряным красителем, включают избыточную загрузку образца, перегревание геля и неадекватную стандартизацию окрашивания/обесцвечивания. Другой подход заключается в объединении разделения с помощью SDS-PAGE с ферментативным расщеплением в геле и жидкостной хроматографией/тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) для определения характеристик капсидных вирусных белков. Однако у этого способа есть ограничения из-за ограниченного извлечения образующихся в результате расщепления пептидов из геля. Кроме того, обращенно-фазовой жидкостной хроматографии недостаточно для разделения капсидных белков в случае определенных серотипов. Может произойти значительное перекрытие вирусных белков, а также плохое полное разделение

пиков вирусных белков, которые фактически были разделены. Кроме того, время разделения, необходимое на один образец, составляет от примерно около 45 до около 60 минут, что в случае промышленных требований соответствует низкой производительности. Jin et al. предлагают прямой LC/MS-анализ интактных белков для определения характеристик капсидных белков ряда серотипов AAV путем идентификации N- и C-концевых последовательностей нескольких капсидных белков исходя из точного измерения масс.

Капиллярный электрофорез, такой как капиллярный электрофорез на микрочипе, представляет собой альтернативную технологию разделения капсидных вирусных белков, которая имеет более высокую производительность (от около 42 до 65 секунд на образец) за счет автоматизации. Обычно с капиллярным электрофорезом для обнаружения белков ассоциировано УФ-детектирование. Однако УФ-детектирование имеет более низкую чувствительность, и для него требуется больший объем образца, в особенности для лекарственных препаратов на основе AAV, когда концентрация белка составляет, как правило, менее 1 мг/мл. Альтернативные способы обнаружения белков включают многократный ввод в колонку в течение одного цикла разделения или флуоресцентное детектирование. Кроме того, образцы, разделенные с использованием капиллярного электрофореза, можно окрашивать флуоресцентными красителями, связывающимися с гидрофобными зонами образца. Однако связывание гидрофобного красителя с белком характеризуется неконтролируемой стехиометрией окрашенных продуктов из-за различной степени гидрофобных зон, в зависимости от серотипа, доступных для связывания красителем. Также сложным является определение количества гидрофобных зон в капсидных белках. Следовательно, соотношение капсидных вирусных белков не может быть оценено точно, используя способ капиллярного электрофореза в сочетании с окрашиванием гидрофобным красителем.

В некоторых типовых вариантах реализации изобретения данная заявка относится к способам и системам для идентификации и/или определения характеристик капсидных вирусных белков вирусных векторов, включающим количественное определение соотношения капсидных вирусных белков вирусных векторов с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе в сочетании с флуоресцентными красителями для конъюгации по лизину. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения данная заявка относится к способу идентификации и/или количественного определения капсидных вирусных белков вирусных векторов, и причем способ включает: денатурирование капсидных вирусных белков вирусных векторов в растворе для денатурации при температуре по меньшей мере около 60°C, вплоть до около 95°C, или, как правило, около 75°C, в течение около 10 мин, причем раствор для денатурации содержит LDS; мечение денатурированных капсидных вирусных белков красителем для конъюгации по лизину; и получение профиля разделения денатурированных/меченых капсидных вирусных белков с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе. В некоторых аспектах капсидные вирусные белки вирусных векторов метят флуоресцентными красителями для конъюгации по лизину. В некоторых аспектах капсидные вирусные белки вирусных векторов метят аминсвязывающими флуоресцентными красителями, содержащими активные сложные эфиры, изотиоцианаты или сульфонилхлориды. В некоторых аспектах активный сложный эфир включает сукцинимидиловые сложные эфиры, сульфосукцинимидиловые сложные эфиры, тетрафторфениловые сложные эфиры или сульфодихлорфеноловые сложные эфиры. В одном аспекте вирусный вектор согласно способу по данной заявке представляет собой AAV, содержащий VP1, VP2 и VP3. В одном аспекте капсидные вирусные белки вирусных векторов можно метить в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях. В случае, когда капсидные вирусные белки метят в восстанавливающих условиях, в качестве восстанавливающего средства можно использовать DTT (дитиотреитол). В случае, когда капсидные вирусные белки метят в невосстанавливающих условиях, можно использовать алкилирующее средство, такое как N-этилmaleимид (NEM) или йодамцетамид (IAM).

В некоторых типовых вариантах реализации изобретения данная заявка относится к способу идентификации капсидных вирусных белков в образце, содержащем вирусные векторы, и причем способ включает: денатурирование капсидных вирусных белков в растворе для денатурации при температуре по меньшей мере около 60°C; мечение денатурированных капсидных вирусных белков красителем для конъюгации по лизину; получение профиля разделения денатурированных/меченых капсидных вирусных белков с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе; количественное определение уровней капсидных вирусных белков исходя из профиля разделения; и определение количественного соотношения капсидных вирусных белков исходя из профиля разделения. В одном аспекте способ по данной заявке дополнительно включает нормализацию количественного соотношения исходя из содержания лизина в капсидных вирусных белках и корректирование количественного соотношения исходя из времени миграции согласно профилю разделения. В одном аспекте вирусный вектор согласно способу по данной заявке представляет собой AAV, содержащий VP1, VP2 и VP3.

В некоторых типовых вариантах реализации изобретения данная заявка относится к системе для идентификации и/или определения количественного соотношения белков, например, капсидных вирусных белков в образце, содержащем вирусные векторы. В некоторых аспектах данная заявка относится к системе, содержащей: микропланшет для приема образца, содержащего вирусные векторы, раствора для денатурации, способного к денатурации двух или более белков, например, капсидных вирусных белков,

в указанном образце при температуре по меньшей мере 60°C, причем раствор для денатурации содержит LDS, и красителя для конъюгации по лизину, способного к мечению двух или более белков; и устройство для капиллярного электрофореза на микрочипе, способное к приему указанного микропланшета, разделению денатурированных/меченых двух или более белков с получением профиля разделения, количественному определению уровней двух или более белков и сравнению количественно определенных уровней двух или более белков с целью определения количественного соотношения двух или более белков. В одном аспекте количественное соотношение может быть нормализовано исходя из содержания лизина в двух или более капсидных вирусных белках. В другом аспекте количественное соотношение может быть нормализовано исходя из времени миграции согласно профилю разделения.

Запросы в отношении улучшения качества продукта, единообразия, эффективности и безопасности биологических препаратов, содержащих AAV, привели к возрастающему запросу в отношении идентификации и/или определения характеристик капсидных вирусных белков AAV. Данная заявка относится к способам и системам для идентификации и/или определения характеристик капсидных вирусных белков в образце, содержащем вирусные векторы. Преимущества способов и систем по данной заявке включают предоставление способов и систем, которые являются быстрыми, надежными, чувствительными и высокопроизводительными, для идентификации и/или определения характеристик капсидных вирусных белков AAV, включая определение соотношений капсидных вирусных белков, для удовлетворения вышеупомянутых запросов. Описанные в данном документе типовые варианты реализации изобретения удовлетворяют вышеупомянутые запросы путем обеспечения способов и систем для идентификации и/или определения характеристик капсидных вирусных белков AAV для удовлетворения давно испытываемой потребности.

Следует понимать, что слова в единственном числе означают "по меньшей мере один", а термины "около" и "примерно" следует понимать как допускающие стандартные отклонения, как будет понятно специалистам в данной области техники; и в случаях, когда приведены диапазоны, включены конечные точки. Подразумевается, что в контексте данного документа термины "включать", "включает" и "включающий" являются неограничивающими, и следует понимать, что они соответственно означают "содержать", "содержит" и "содержащий".

В некоторых типовых вариантах реализации изобретения данная заявка относится к способу идентификации и определения количественного соотношения двух или более белков в образце, содержащем вирусные частицы, и причем способ включает: денатурирование двух или более белков в образце в растворе для денатурации при температуре по меньшей мере 60°C; мечение денатурированных двух или более белков красителем для конъюгации по лизину; получение профиля разделения денатурированных/меченых двух или более белков с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе; количественное определение уровней двух или более белков исходя из профиля разделения; и определение количественного соотношения двух или более белков исходя из профиля разделения.

В контексте данного документа термин "капиллярный электрофорез на микрочипе" относится к подходу для высокоскоростного разделения биомолекул в присутствии электроосмотического потока с использованием электрофореза в открытой трубке, как, например, в стеклянных капиллярах, в микрожидкостном формате. Электроосмотический поток представляет собой явление объемного потока раствора, который возникает в капиллярах, заполненных раствором слабой ионной силы, при приложении напряжения в капилляре. Скорость данного вида анализа в ходе разделения с помощью капиллярного электрофореза определяется подвижностью аналита и электроосмотическим потоком. Электрофоретическая подвижность молекул аналита является крайне важным фактором для разделения, на который могут влиять масса и суммарный заряд аналита. (Charles S. Henry, *Microchip Capillary Electrophoresis: An Introduction*, February 2006, *Methods in Molecular Biology* 339:1-10). При капиллярном электрофорезе на микрочипе используются значения напряжения порядка 1 кВ, и при длине канала в диапазоне от значений меньше миллиметра до сантиметров это соответствует от 100 В/см до 10 кВ/см.

В контексте данного документа термин "вектор" относится к рекомбинантным плазмиде или вирусу, которые содержат нуклеиновую кислоту, подлежащую доставке в клетку-хозяина, либо *in vitro*, либо *in vivo*. Полученные на основе AAV векторы являются особенно перспективными для доставки генетического материала, поскольку (i) они способны к инфицированию (трансдукции) широкого спектра неделящихся и делящихся типов клеток, включая мышечные волокна и нейроны; (ii) они лишены вирусных структурных генов, благодаря чему исключены естественные ответы клетки-хозяина на вирусную инфекцию, например, интерферон-опосредованные ответы; (iii) AAV дикого типа никогда не были ассоциированы с каким-либо патологическим состоянием у людей; (iv) в отличие от AAV дикого типа, которые способны к интеграции в геном клетки-хозяина, дефектные по репликации AAV-векторы обычно персистируют в виде эписом, ограничивая таким образом риск инсерционного мутагенеза или активации онкогенов; и (v) в отличие от других векторных систем, AAV-векторы не провоцируют значимого иммунного ответа (см. ii), что обеспечивает длительную экспрессию терапевтических трансгенов (при условии, что их генные продукты не отторгаются).

В контексте данного документа термин "белок" включает любой полимер из аминокислот, имеющий ковалентные амидные связи. Белки содержат одну или несколько полимерных цепей из аминокис-

лот, в целом известных в данной области техники как "пептиды" или "полипептиды". Белок может содержать один или множество полипептидов, образующих единую функционирующую биомолекулу.

Типовые варианты реализации изобретения

Описанные в данном документе варианты реализации изобретения относятся к способам и системам для идентификации и/или определения характеристик капсидных вирусных белков в образце, содержащем вирусные векторы.

В некоторых типовых вариантах реализации изобретения данная заявка относится к способу определения количественного соотношения двух или более капсидных вирусных белков в образце, содержащем вирусные векторы, и причем способ включает: денатурирование капсидных вирусных белков в образце в растворе для денатурации при температуре по меньшей мере около 60°C; мечение денатурированных капсидных вирусных белков красителем для конъюгации по лизину; получение профиля разделения денатурированных/меченых капсидных вирусных белков с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе; количественное определение уровней капсидных вирусных белков исходя из профиля разделения; сравнение количественно определенных уровней капсидных вирусных белков с целью определения количественного соотношения капсидных вирусных белков; и нормализацию количественного соотношения капсидных вирусных белков исходя из содержания лизина в капсидных вирусных белках.

В одном аспекте капсидные вирусные белки в образце денатурируют в растворе для денатурации при температуре по меньшей мере около 60°C, по меньшей мере около 65°C, по меньшей мере около 70°C, по меньшей мере около 75°C, по меньшей мере около 80°C, по меньшей мере около 85°C, по меньшей мере около 90°C, по меньшей мере около 95°C, от около 60°C до 95°C, от около 70°C до 95°C, от около 75°C до 95°C, от около 80°C до 95°C или от около 85°C до 95°C в течение около 3 мин, около 4 мин, около 5 мин, около 6 мин, около 7 мин, около 8 мин, около 9 мин или около 10 мин. В другом аспекте капсидные вирусные белки в образце можно денатурировать в растворе для денатурации путем постепенного нагревания в диапазоне от около 60°C до 95°C, от около 70°C до 95°C, от около 75°C до 95°C, от около 80°C до 95°C или от около 85°C до 95°C в течение около 3 мин, около 4 мин, около 5 мин, около 6 мин, около 7 мин, около 8 мин, около 9 мин или около 10 мин.

В одном аспекте краситель для конъюгации по лизину согласно способу по данной заявке представляет собой аминсвязывающий флуоресцентный краситель, содержащий активный сложный эфир, изотиоцианат или сульфонила хлорид. В одном аспекте краситель для конъюгации по лизину согласно способу по данной заявке содержит активный сложный эфир, причем активный сложный эфир включает сукцинимидиловый сложный эфир, сульфосукцинимидиловый сложный эфир, тетрафторфениловый сложный эфир или сульфодихлорфеноловый сложный эфир.

Следует понимать, что указанная система не ограничена любым из вышеупомянутых AAV, устройства для капиллярного электрофореза на микрочипе, капсидных вирусных белков, красителя для конъюгации по лизину или аминсвязывающего флуоресцентного красителя. Как описано выше, одно из преимуществ способа и системы по данному изобретению заключается в том, что, в отличие от традиционных способов, как, например, таковых с использованием гидрофобного красителя, использование красителя для конъюгации по лизину обеспечивает точную идентификацию и количественное определение любого белка, при условии, что число лизиновых остатков в аминокислотной последовательности является известным. Таким образом, например, несмотря на то, что в качестве примеров могут быть приведены конкретные вирусы, следует понимать, что способ и систему по данному изобретению можно применять для других серотипов AAV и других вирусов.

Последовательное обозначение представленных в данном документе этапов способа цифрами и/или буквами не подразумевает ограничения способа или любых его вариантов реализации конкретным указанным порядком. Различные публикации, включая патенты, заявки на выдачу патента, опубликованные заявки на выдачу патента, номера доступа, технические статьи и научные статьи цитируются по всему описанию. Каждая из этих цитируемых ссылок включена в данном документе посредством ссылки в полном объеме и во всех отношениях. Если не указано иное, все применяемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. Данное описание будет более понятным в привязке к нижеследующим примерам, которые приведены для более подробного описания данного раскрытия. Они предназначены для иллюстрации и не должны истолковываться как ограничивающие объем данного описания.

Примеры

Реагенты и способы

1. Подготовка образца, мечение и анализ с использованием красителя для конъюгации по лизину: капсидные вирусные белки метили флуоресцентными красителями, используя красители для конъюгации по лизину или аминсвязывающие флуоресцентные красители, такие как краситель для мечения *Pico Protein Express* (PerkinElmer). Аминсвязывающие флуоресцентные красители могут вступать в реакцию с первичными аминами, связываясь с лизиновыми остатками и N-концевыми аминогруппами. После гашения реакции мечения отслеживали распространенность и положение флуоресцентного красителя. Белки

имеют разное содержание лизиновых остатков, доступных для мечения. Количества красителя и концентрации белка титруют и оптимизируют для реакций мечения.

Набор реагентов для анализа Pico Protein Express (PerkinElmer) использовали для мечения образцов белка, имеющих диапазоны концентраций 0,1-1 мг/мл в буфере с pH 6-9, согласно инструкции по использованию от производителя (инструкция по использованию для анализа Pico Protein Express для LabChip® GXII Touch, PerkinElmer, Хопкинтон, Массачусетс). Для мечения образцов использовали буфер для мечения, содержащий флуоресцентный краситель для конъюгации по лизину. Состав 1X буфера для мечения из набора реагентов для анализа Pico Protein Express для подготовки образцов является следующим: 0,1 М бикарбонат натрия, 0,14% LDS, pH 8. Буфер для образцов также содержит LDS. Образцы белка можно метить в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях. Для мечения образца белка в восстанавливающих условиях в качестве восстанавливающего средства использовали DTT, как показано на фиг. 3, согласно инструкциям производителя. На фиг. 3 показан процесс подготовки образца в восстанавливающих условиях с использованием IgG в качестве примера. На фиг. 4 показан процесс подготовки образца для мечения белков красителями для конъюгации по лизину в невосстанавливающих условиях с использованием IgG в качестве примера согласно инструкциям производителя. Для невосстанавливающих условий можно использовать алкилирующее средство, такое как NEM или йодацетамид.

Меченые образцы белка, содержащие капсидные вирусные белки, загружали на микрожидкостный чип, подлежащий анализу с использованием LabChip® GXII, LabChip® GXII Touch или LabChip® GXII Touch HT с использованием флуоресцентного детектирования. Соответствующие типы анализа выбирали из перечня анализов, предусмотренного приборами. Для разделения белков по размеру в диапазоне 14-100 кДа был выбран Pico Protein Express 100. Для разделения белков по размеру в диапазоне 14-200 кДа был выбран Pico Protein Express 200. Функция анализа прибора позволяет определять концентрацию белка на основе выравнивания и сопоставления со стандартными белками. После выравнивания размер каждого белка, дающего пик, рассчитывали на основе выровненного времени пика, используя \log (размер) в зависимости от $1/\text{время}$, сопоставленного с основными пиками, соответствующими набору маркеров известных размеров и измеренному времени миграции. С целью определения концентрации образца, соответствующего определенному пику, площади пиков сначала корректируют, чтобы компенсировать интенсивность флуоресценции. Замеры значений интенсивности флуоресценции происходят с постоянным интервалом времени, а значит, медленно движущиеся белки проводят больше времени под действием детектора, чем быстро движущиеся белки. Затем можно рассчитывать соответствующую определенному пику концентрацию, используя площади пиков, соответствующих набору маркеров, и концентрацию для набора маркеров, представленные в окне анализа (Assay Analysis). Концентрация корректируется по кратностям разведения образца и набора маркеров (инструкция по использованию для анализа Pico Protein Express для LabChip® GXII Touch, PerkinElmer, Хопкинтон, Массачусетс).

2. Стандарт молекулярной массы белка: Набор маркеров Pico Protein Express (PerkinElmer) использовали для калибровки или оценки молекулярной массы капсидных вирусных белков AAV. Набор маркеров молекулярных масс белка готовили в виде серийных разведений в диапазоне от 7,8 нг/мкл до 250 нг/мкл, используя кратность разведения 1:2. Использовали шесть стандартных белков с молекулярной массой 15,9 кДа (LA1), 20,4 кДа (LA2), 28,9 кДа (LA3), 48,4 кДа (LA4), 68,4 кДа (LA5) или 119,2 кДа (LA6). Как показано на фиг. 5, пики стандартных белков появляются в порядке увеличения времени миграции, что соответствует белкам увеличивающегося размера. Сначала появляется нижний маркер (LM) при малом времени миграции.

Прибор

Капиллярный электрофорез на микрочипе осуществляли, используя анализ ProteinEXact™ или анализ Pico Protein Express в системе LabChip® GXII, LabChip® GXII Touch или LabChip® GXII Touch HT (PerkinElmer, Хопкинтон, Массачусетс). В системе капиллярного электрофореза LabChip® GXII Touch используется микрожидкостный чип с одним устройством непрерывной подачи пробы для разделения белков, включая функции автоматизации электрофоретического разделения и анализа. Образцы загружали в 24-, 96- или 384-луночные микропланшеты (или "планшеты") для анализа. Оптика системы может детектировать индуцированный лазером флуоресцентный сигнал. Функция анализа системы обеспечивает автоматический анализ данных для получения относительной концентрации белка, размера молекулы и процента чистоты с использованием набора маркеров и маркеров в качестве калибровочных стандартов. С помощью указанной системы можно разделять белки по размеру с разрешением в диапазоне от 14 до 200 кДа. Чувствительность анализа Protein Pico эквивалентна окрашиванию серебряным красителем. Образец можно анализировать за 42 секунды в случае Pico Protein Express или за 65 с в случае ProteinEXact™. Пропускная способность составляет до 384 образцов в случае Pico Protein Express или 96 образцов для ProteinEXact™ на одну подготовку чипа.

Пример 1. Определение характеристик капсидных вирусных белков с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе в сочетании с гидрофобным красителем

Капсидные вирусные белки анализировали с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе в сочетании с гидрофобным красителем. Капсидные вирусные белки анализировали и определяли

их характеристики, используя систему LabChip® GXII Touch HT (PerkinElmer) в сочетании с анализом ProteinEXact™ (PerkinElmer). Анализ ProteinEXact™ проводили согласно инструкциям производителя (PerkinElmer, Хопкинтон, Массачусетс, инструкция по использованию для анализа ProteinEXact™ HR для LabChip® GXII Touch). Краситель Clear HR из набора реагентов добавляли в гелевую матрицу ProteinEXact™ для обнаружения белков. В системе капиллярного электрофореза LabChip® GXII Touch используется микрожидкостный чип с одним устройством непрерывной подачи пробы для разделения белков, включая функции автоматизации окрашивания, обесцвечивания, электрофоретического разделения и анализа. В ней также используется этап калибровки непосредственно в системе для обеспечения воспроизводимости и показателей чувствительности.

Система LabChip® GXII Touch HT в сочетании с анализом ProteinEXact™ представляет собой высокопроизводительную систему для анализа и определения характеристик белков с использованием микрожидкостного капиллярного электрофореза в присутствии SDS, например, MCE-SDS. AAV серотипа 8 (AAV8) был получен в клетках HEK-293 и содержал по меньшей мере 5×10^{12} копий генома/мл в D-PBS. Перед проведением анализа образцы, содержащие AAV8, подвергали денатурации, как, например, путем нагревания образцов при около 75°C. В случаях, когда образцы белка готовили и денатурировали в невозстанавливающих условиях, образцы белка обрабатывали йодамцетамидом. В случаях, когда образцы белка готовили и денатурировали в восстанавливающих условиях, образцы белка обрабатывали DTT.

Выходные данные анализа ProteinEXact™, запущенного в окне просмотра анализов, представляют собой относительную электрофореграмму с количественным анализом размера, флуоресценции, концентрации и процентного вклада каждого отдельного белка по отношению к общему белку в образце. Разделенные пики на электрофореграмме включают VP1, VP2, VP3 и примеси. Рассчитывали скорректированную площадь под кривой (AUC) для каждого белка, соответствующую концентрации, которую использовали для определения соотношения капсидных вирусных белков в образце. Капсидные вирусные белки AAV8 разделяли, используя капиллярный электрофорез в сочетании с окрашиванием красителем Protein Clear HR для обнаружения белка, как показано на фиг. 6А. По оси X на фиг. 6А представлен размер в кДа. По оси Y представлена флуоресценция, соответствующая концентрации. Двенадцать электрофореграмм были наложены для демонстрации воспроизводимости анализа, как показано на фиг. 6В. На фиг. 6В показано рассчитанное соотношение VP1:VP2:VP3 исходя из средней концентрации для каждого пика, которое было нормализовано к VP1. Как показано на фиг. 6В, рассчитанное соотношение капсидных вирусных белков AAV8, VP1:VP2:VP3, составляло 1,0: 1,7: 11,3. Это соотношение VP1:VP2:VP3, 1,0: 1,7: 11,3, значительно отклоняется от теоретического соотношения 1:1:10.

Пример 2. Определение характеристик капсидных вирусных белков с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе в сочетании с красителями для конъюгации по лизину

Количество и характеристики капсидных вирусных белков AAV определяли, используя капиллярный электрофорез на микрочипе в сочетании с флуоресцентными красителями для конъюгации по лизину. Капсидные вирусные белки AAV анализировали и определяли их характеристики, используя систему LabChip® GXII Touch HT в присутствии LDS в сочетании с анализом Pico Protein Express. Анализ Pico Protein Express, включающий мечение белка, выполняли согласно инструкциям производителя, с дополнительными оптимизациями, как показано в табл. 1. Краситель для мечения из набора реагентов Pico Protein Express использовали для мечения капсидных вирусных белков путем конъюгирования со свободными аминами, такими как лизиновые остатки капсидных вирусных белков. В системе капиллярного электрофореза LabChip® GXII Touch HT используется микрожидкостный чип с одним устройством непрерывной подачи пробы для разделения белков, включая функции автоматизации электрофоретического разделения и анализа. В ней также используется этап калибровки непосредственно в системе для обеспечения воспроизводимости и показателей чувствительности.

Таблица 1
Оптимизированные параметры для анализа Pico Protein Express

Параметры способа	Pico 1.0	Pico 2.0
Невосстанавливающий буфер	100 мМ фосфат натрия+1% LDS+165 мМ IAM	120 мМ фосфат натрия+1,2% LDS+200 мМ IAM
уровень pH восстанавливающих условий	6-9	8
Восстанавливающий буфер	100 мМ фосфат натрия+1% LDS+140 мМ DTT	120 мМ фосфат натрия+1,2% LDS+80 мМ DTT
уровень pH восстанавливающих условий	9	8
Температура денатурации AAV8 (°C)	75; 95	65

Температура денатурации других серотипов AAV (°C)	95	95
Рабочая концентрация (мг/мл)	0,1	0,1
Концентрация красителя (мкМ)	10	16
Мечение набором маркеров	Свежеприготовленный (в пределах 4 часов)	Готовый/замороженный при -20°C
Время разделения/образец (с)	42	65

AAV были получены в клетках HEK-293 и, как было зарегистрировано, они содержали по меньшей мере 5×10^{12} копий генома/мл в D-PBS. Для анализа использовали образцы AAV8, содержащие разные нагрузки, нагрузку А, В или С. Образцы AAV8 метили красителем для мечения Pico Protein Express в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях согласно инструкциям производителя, как показано на фиг. 3 и фиг. 4, с оптимизациями Pico 1.0, подробно описанными в табл. 1. В случаях, когда образцы белка готовили и денатурировали в восстанавливающих условиях, образцы белка обрабатывали йодамцетамидом. В случаях, когда образцы белка готовили и денатурировали в восстанавливающих условиях, образцы белка обрабатывали DTT. Образец AAV8 смешивали с буфером для мечения, содержащим LDS, с восстанавливающим средством или без него. Затем образцы, содержащие AAV8, подвергали денатурации путем нагревания образцов при 75°C в течение 10 мин. Краситель для мечения Pico Protein Express добавляли к денатурированным образцам AAV8 с перемешиванием в течение одной минуты, с последующей инкубацией при 35°C в течение 30 мин в темноте. Для остановки реакции конъюгации с красителем в образец добавляли останавливающий раствор. Денатурированные и меченые образцы AAV8 подвергали анализу, используя анализ Pico Protein Express в системе капиллярного электрофореза LabChip® GXII Touch HT.

Выходные данные анализа Pico Protein Express, запущенного в окне просмотра анализов, представляют собой относительную электрофореграмму с количественным анализом размера, флуоресценции и процентного вклада каждого отдельного белка по отношению к общему белку в образце. Разделенные пики на электрофореграмме включают VP1, VP2, VP3 и примеси. Меченые капсидные вирусные белки AAV8 разделяли, используя капиллярный электрофорез, как показано на фиг. 7. По оси X на фиг. 7 представлено время миграции. По оси Y представлена флуоресценция (RFU), соответствующая концентрации. Рассчитывали скорректированную площадь под кривой (AUC) для каждого белка, соответствующую концентрации, которую использовали для определения соотношения капсидных вирусных белков в образце.

В табл. 2 показаны рассчитанные соотношения капсидных вирусных белков, VP1:VP2:VP3, для трех образцов AAV8 с использованием анализа Pico Express Pico 1.0. В табл. 2 также приведено соответствующее число лизиновых остатков и время миграции для каждого капсидного вирусного белка. В табл. 3 показаны соответствующие определенные молекулярные массы VP1, VP2 и VP3. Поскольку каждый капсидный вирусный белок имеет различное содержание лизина, соотношения были нормализованы с использованием содержания лизиновых остатков и скорректированы с учетом времени миграции в каналах микрочипа, как показано в табл. 4. Соотношения были нормализованы к VP1.

Таблица 2

Соотношения капсидных вирусных белков с использованием Pico 1.0

Соотношение согласно Pico 1.0	VP3	VP2	VP1
AAV8-нагрузка А	4,4	1,2	1
AAV8-нагрузка В	4,3	1,1	1
AAV8-нагрузка С	4	1,4	1
Число лизиновых остатков	17	22	32
Время миграции (мин)	0,334	0,351	0,368

Таблица 3

Определенные молекулярные массы капсидных вирусных белков

MW (кДа)	VP3	VP2	VP1
AAV8-нагрузка А	72,5	88,8	109,1
AAV8-нагрузка В	72,5	90,3	110,6
AAV8-нагрузка С	73,8	92,3	113,6

Таблица 4

Нормализованные и скорректированные соотношения белков с использованием Pico 1.0

Нормализованное и скорректированное соотношение согласно Pico 1.0	VP3	VP2	VP1
AAV8-нагрузка А	9,1	1,8	1,0
AAV8-нагрузка В	8,9	1,7	1,0
AAV8-нагрузка С	8,3	2,1	1,0

Кроме того, для оценки соотношений капсидных вирусных белков использовали дополнительно оптимизированный анализ Pico Express Pico 2.0, как подробно описано в табл. 1. В табл. 5 показаны рассчитанные соотношения капсидных вирусных белков, VP1:VP2:VP3, для трех образцов AAV8 с использованием анализа Pico Express Pico 2.0. В табл. 5 также приведено соответствующее число лизиновых остатков для каждого вирусного белка. Поскольку каждый капсидный вирусный белок имеет различное содержание лизина, соотношения белков были нормализованы с использованием содержания лизиновых остатков и скорректированы с учетом времени миграции в каналах микрочипа, как показано в табл. 6.

Таблица 5

Соотношения капсидных вирусных белков с использованием Pico 2.0

Соотношение согласно Pico 2.0	VP3	VP2	VP1
AAV8-нагрузка А	5,2	1	1
AAV8-нагрузка В	5,1	1,1	1
AAV8-нагрузка С	5,0	1,3	1
Число лизиновых остатков	17	22	32

Таблица 6

Нормализованные и скорректированные соотношения белков для Pico 2.0

Нормализованное и скорректированное соотношение согласно Pico 2.0	VP3	VP2	VP1
AAV8-нагрузка А	9,8	1,4	1,0
AAV8-нагрузка В	9,3	1,5	1,0
AAV8-нагрузка С	9,9	2,0	1,0

Эти соотношения белков были нормализованы к VP1. Оптимизация с использованием Pico 2.0 обеспечивала улучшение в отношении интенсивности сигнала и воспроизводимости данных, и она подходит для образцов с более низкими концентрациями.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения количественного соотношения двух или более белков в образце, содержащем по меньшей мере один вирусный вектор, включающий:

(а) денатурирование двух или более белков в образце в растворе для денатурации при температуре по меньшей мере около 60°C;

(b) мечение денатурированных двух или более белков красителем для конъюгации по лизину;

(с) получение профиля разделения меченых двух или более белков с использованием капиллярного электрофореза на микрочипе;

(d) количественное определение уровней двух или более белков исходя из профиля разделения; и

(е) сравнение количественно определенных уровней двух или более белков с целью определения количественного соотношения указанных двух или более белков.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий нормализацию количественного соотношения исходя из содержания лизина в двух или более белках.

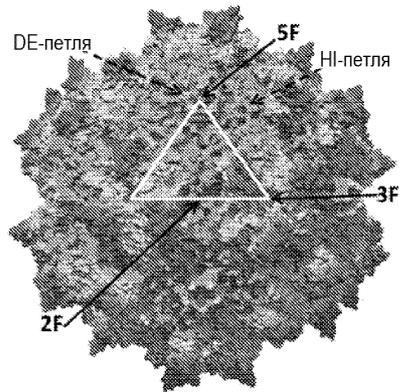
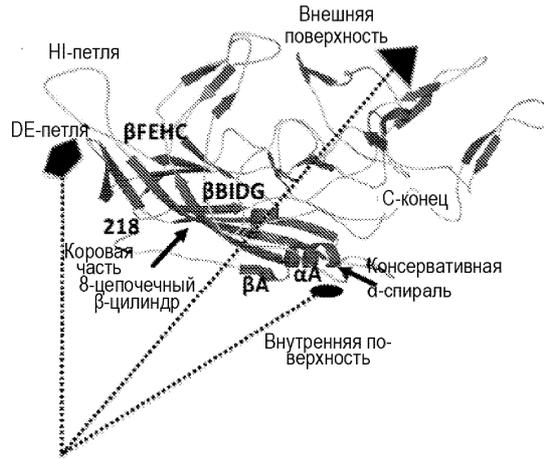
3. Способ по п.1, дополнительно включающий корректирование количественного соотношения исходя из времени миграции согласно профилю разделения.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что краситель для конъюгации по лизину представляет собой аминсвязывающий флуоресцентный краситель.

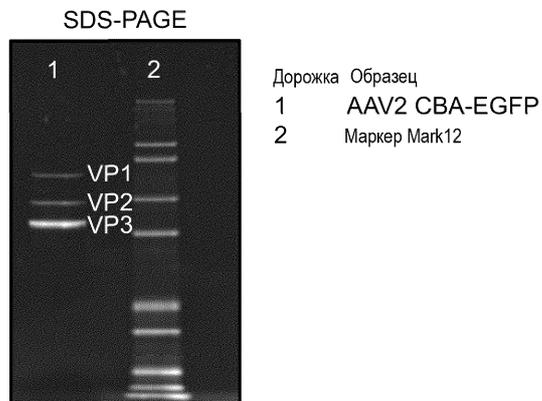
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что краситель для конъюгации по лизину содержит активный сложный эфир, изотиоцианат или сульфониламинхлорид.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что краситель для конъюгации по лизину содержит активный сложный эфир, причем активный сложный эфир включает сукцинимидиловый сложный эфир, сульфосукцинимидиловый сложный эфир, тетрафторфениловый сложный эфир или сульфодихлорфеноловый сложный эфир.

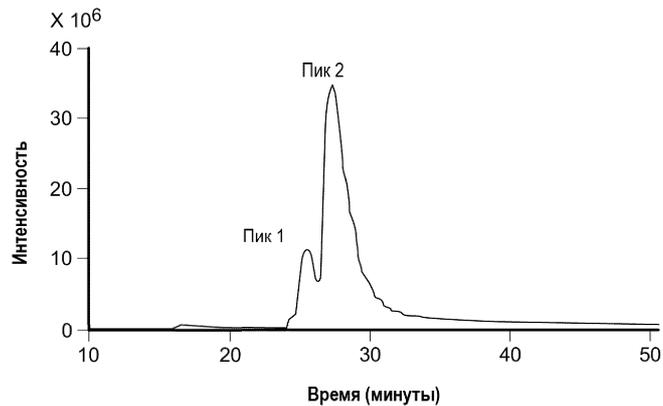
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирус.
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один вирусный вектор содержит вирусный белок 1 (VP1), вирусный белок 2 (VP2) и вирусный белок 3 (VP3).
9. Способ по п.1, отличающийся тем, что раствор для денатурации содержит детергент.
10. Способ по п.1, отличающийся тем, что раствор для денатурации содержит додецилсульфат лития (LDS) или додецилсульфат натрия (SDS).
11. Система для определения количественного соотношения двух или более белков в образце, содержащем по меньшей мере один вирусный вектор, содержащая:
микропланшет для приема:
образца, содержащего по меньшей мере один вирусный вектор,
раствора для денатурации, способного к денатурации двух или более белков в указанном образце при температуре по меньшей мере около 60°C, и
красителя для конъюгации по лизину, способного к мечению двух или более белков; и
устройство для капиллярного электрофореза на микрочипе, способное к следующему:
прием указанного микропланшета,
разделение меченых двух или более белков с получением профиля разделения,
количественное определение уровней двух или более белков и
сравнение количественно определенных уровней двух или более белков с целью определения количественного соотношения указанных двух или более белков.
12. Система по п.11, отличающаяся тем, что краситель для конъюгации по лизину представляет собой аминсвязывающий флуоресцентный краситель.
13. Система по п.11, отличающаяся тем, что краситель для конъюгации по лизину содержит активный сложный эфир, изотиоцианат или сульфонилхлорид.
14. Система по п.11, отличающаяся тем, что краситель для конъюгации по лизину содержит активный сложный эфир, причем активный сложный эфир включает сукцинимидиловый сложный эфир, сульфосукцинимидиловый сложный эфир, тетрафторфениловый сложный эфир или сульфодихлорфеноловый сложный эфир.
15. Система по п.11, отличающаяся тем, что по меньшей мере один вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирус.
16. Система по п.11, отличающаяся тем, что по меньшей мере один вирусный вектор содержит вирусный белок 1 (VP1), вирусный белок 2 (VP2) и вирусный белок 3 (VP3).
17. Система по п.11, отличающаяся тем, что раствор для денатурации содержит детергент.
18. Система по п.11, отличающаяся тем, что раствор для денатурации содержит додецилсульфат лития (LDS) или додецилсульфат натрия (SDS).



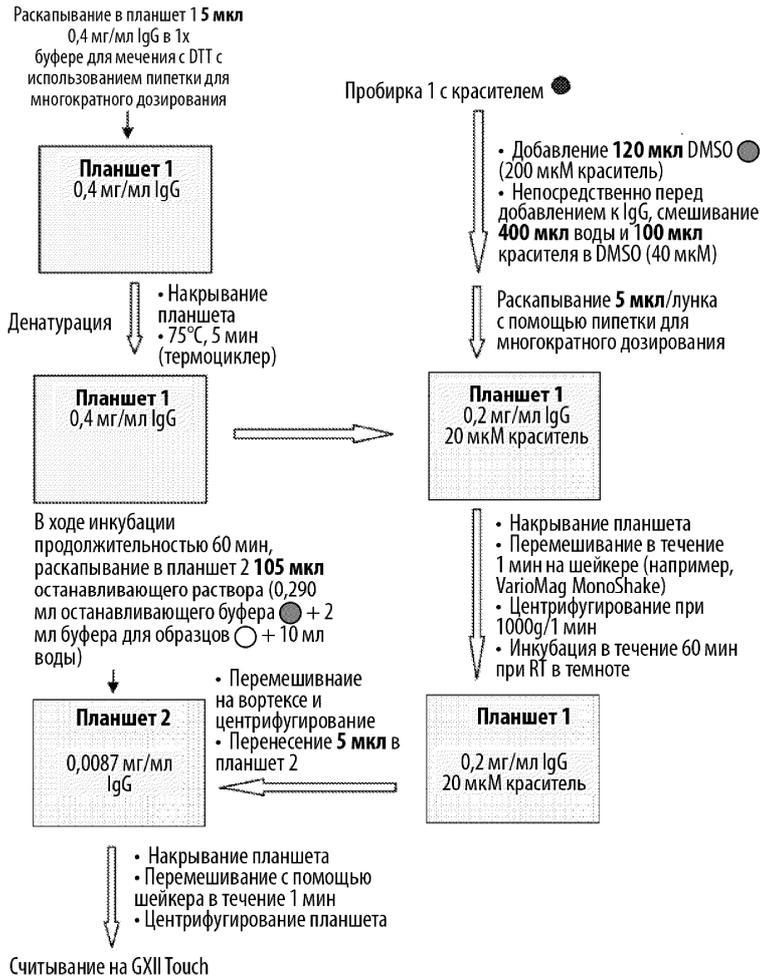
Фиг. 1



Обращенно-фазовая жидкостная хроматография



Фиг. 2



Фиг. 3

Раскапывание в планшет 1 **5 мкл**
0,4 мг/мл IgG в 1х
 буфере для мечения/200 мМ буфер
 NEM с использованием пипетки для
 многократного дозирования

Планшет 1
 0,4 мг/мл IgG

Денатурация ↓
 • Накрывание планшета
 • 75°C, 5 мин
 (термоциклер)

Планшет 1
 0,4 мг/мл IgG

Пробирка 1 с красителем ●

↓
 • Добавление **120 мкл DMSO** ●
 (200 мкМ краситель)
 • Непосредственно перед
 добавлением к IgG, смешивание
400 мкл воды и **100 мкл**
 красителя в DMSO (40 мкМ)

↓
 Раскапывание **5 мкл/лунка**
 с помощью пипетки для
 многократного дозирования

Планшет 1
 0,2 мг/мл IgG
 20 мкМ краситель

В ходе инкубации
 продолжительностью 60 мин,
 откапывание в планшет 2 **105**
мкл останавливающего раствора
 (0,290 мл останавливающего
 буфера ● + 2 мл буфера для
 образцов ○ + 10 мл воды)

↓
 • Перемешивание на вортексе
 и центрифугирование
 • Перенесение **5 мкл** в
 планшет 2

Планшет 2
 0,0087 мг/мл
 IgG

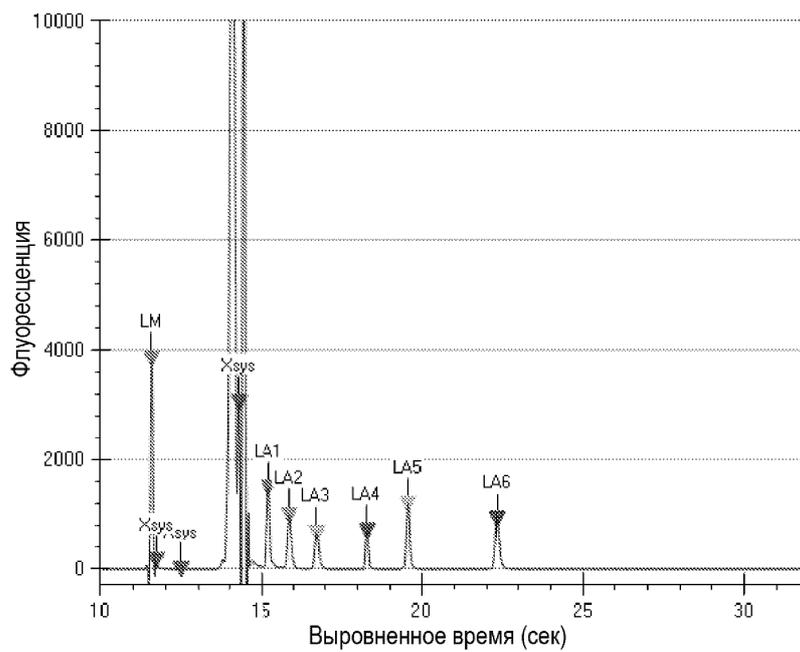
↓
 • Накрывание планшета
 • Перемешивание на шейкере
 (например, VarioMag MonoShake)
 • Центрифугирование при 1000g/1
 мин
 • Инкубация в течение 60 мин при
 RT в темноте

Планшет 1
 0,2 мг/мл IgG
 20 мкМ краситель

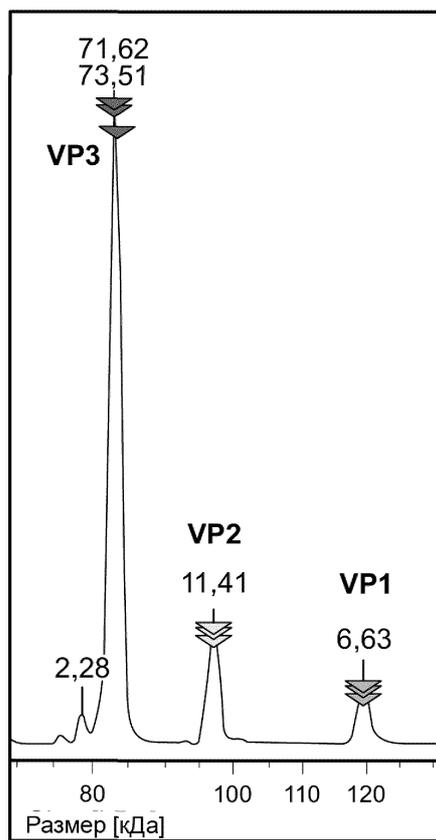
↓
 • Накрывание планшета
 • Перемешивание с помощью магнитной
 мешалки в течение 1 мин
 • Центрифугирование планшета

Считывание на GXII Touch

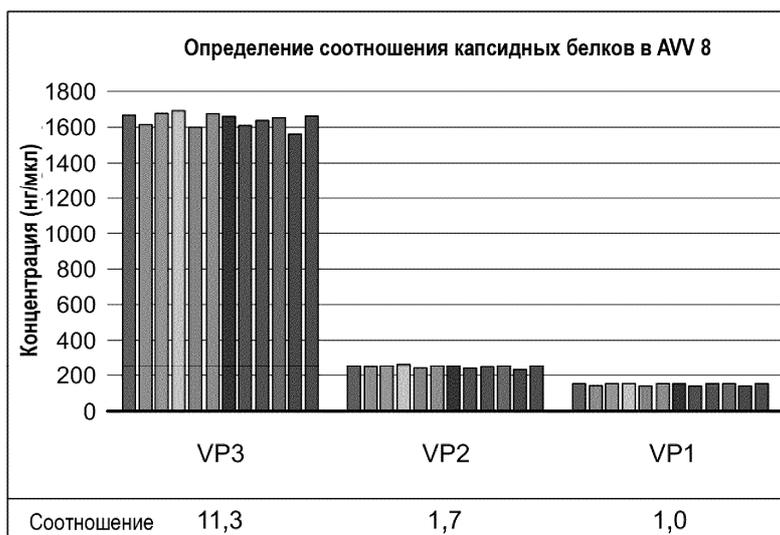
Фиг. 4



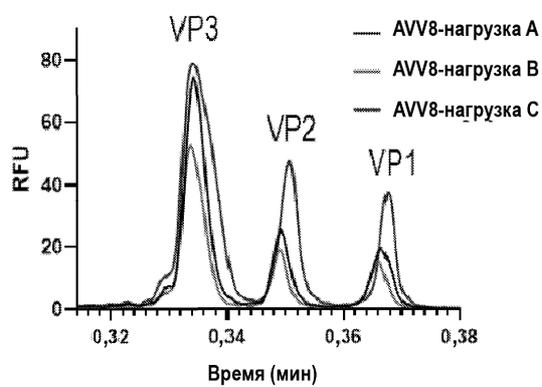
Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 7

