

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393300** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.17

(22) Дата подачи заявки
2022.06.01

(51) Int. Cl. **G01N 27/447** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 1/26 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) **АНАЛИЗЫ И РЕАГЕНТЫ ДЛЯ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА
МИКРОЧИПАХ**

(31) **17/335,756; 17/368,377**

(32) **2021.06.01; 2021.07.06**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/031738**

(87) **WO 2022/256383 2022.12.08**

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Рилман Тимоти, Карро Габриэль,

Шнайдерхайнце Джеффри, Нолл

Николь М. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены анализы и реагенты для капиллярного электрофореза на микрочипах (МСЕ) для оценки чистоты и определения примесей в образцах продуктов, представляющих собой белковые лекарственные средства. Предложены способы анализа аналитов в образце белкового лекарственного средства.

A1

202393300

202393300

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-5799674EA/019

АНАЛИЗЫ И РЕАГЕНТЫ ДЛЯ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА НА МИКРОЧИПАХ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка является частичным продолжением заявки на патент США № 17/335,756, поданной 1 июня 2021 г., которая является частичным продолжением заявки на патент США № 16/355,050, поданной 15 марта 2019 г., которая испрашивает преимущество и приоритет по предварительной заявке США № 62/644,933, поданной 19 марта 2018 г. Данная заявка также является частичным продолжением заявки на патент США № 16/355,050, поданной 15 марта 2019 г., которая испрашивает преимущество и приоритет по предварительной заявке США № 62/644,933, поданной 19 марта 2018 г. Каждая из этих заявок полностью включена посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] Аспекты изобретения в основном относятся к области капиллярного электрофореза, в частности, к капиллярному электрофорезу на микрочипах.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Реализация надежной, воспроизводимой и удобной для пользователя технологии имеет решающее значение для удовлетворения потребностей в тестировании биологических продуктов в современных лабораториях контроля качества (КК). Модернизация технологии необходима для содействия увеличению производительности, при этом продолжая генерировать качественные аналитические данные и пытаясь свести к минимуму количество недействительных результатов тестов и связанных с приборами исследований. Хотя электрофорез традиционно использовали при КК для анализа чистоты и фрагментации продукта, методология перешла от гелевой к капиллярной, а в последнее время и к методологии на микрочипах. Капиллярный электрофорез на микрочипах (МСЕ) обеспечивает существенное сокращение отрезков времени анализа образцов, сохраняя при этом стандарты производительности и воспроизводимости, необходимые для анализа КК (Ouimet, C., et al., *Expert Opin Drug Discov.*, 12(2): 213-224 (2017)).

[4] Хотя МСЕ стал многообещающим методом, который все больше используют в фармацевтической промышленности для определения характеристик биофармацевтических препаратов, контроля качества и открытия лекарственных средств, он может быть подвержен мешающему воздействию при анализе.

[5] Таким образом, одной из целей изобретения является предложение улучшенных анализов МСЕ и композиций, которые снижают мешающее воздействие при анализе.

[6] Еще одной целью изобретения является предложение анализов МСЕ и композиций для улучшения обнаружения примесей в продукте, представляющем собой белковое лекарственное средство.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] Предложены анализы и реагенты МСЕ для оценки чистоты и определения примесей в образцах продуктов, представляющих собой белковые лекарственные средства. Предложены способы анализа аналитов в образце белкового лекарственного средства. Предпочтительные белковые лекарственные средства включают в себя, без ограничений, рекомбинантные белки, такие как антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, а также слитые белки. В анализах используют методы МСЕ для разделения, определения и количественного определения белкового продукта и примесей в белковом продукте. Примеси включают в себя, без ограничений, белковые агрегаты, белковые фрагменты, белковые мультимеры и загрязняющие вещества при анализе. Также предложены восстанавливающие и невосстанавливающие буферы. В некоторых вариантах осуществления изобретения анализы и реагенты МСЕ, предложенные в данном документе, можно использовать при анализе и тестировании чистоты продуктов против SARS-CoV-2, таких как терапевтические белковые продукты, включая REGEN-COV™ (казиривимаб и имдевимаб).

[8] В одном варианте осуществления изобретения предложен невосстанавливающий водный буфер образца для электрофореза, содержащий алкилирующий агент, такой как 2-йодацетамид (IAM), йодоуксусная кислота (IAA) или N-этилмалеимид (NEM). В одном варианте осуществления изобретения невосстанавливающий водный буфер образца для электрофореза содержит алкилирующий агент, от 155 до 175 мМ 2-йодацетамида; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 65 до 95 мМ фосфата натрия, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет pH менее 7. В одном варианте осуществления изобретения pH буфера составляет 6. В другом варианте осуществления изобретения водный буфер содержит 166 мМ 2-йодацетамида, 0,81% додецилсульфата лития и 81 мМ фосфата натрия.

[9] В другом варианте осуществления изобретения невосстанавливающий водный буфер образца для электрофореза содержит алкилирующий агент, например, от 50 до 250, или от 155 до 200, или от 155 до 250 мМ 2-йодацетамида; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 40 до 80 мМ или от 50 до 70 мМ фосфата натрия, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет pH менее или равный 8. В одном варианте осуществления изобретения pH буфера составляет 8. В еще одном варианте осуществления изобретения водный буфер содержит 200 мМ 2-йодацетамида, 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия.

[10] В другом варианте осуществления изобретения невосстанавливающий водный буфер образца для электрофореза содержит алкилирующий агент, например от 155 до 200 мМ 2-йодацетамида; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 50 до 70 мМ фосфата натрия, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет pH 8 или менее. В одном варианте осуществления изобретения pH буфера составляет 6. В еще одном варианте осуществления изобретения водный буфер содержит 200 мМ 2-йодацетамида, 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия.

[11] Также предлагается восстанавливающий буфер. В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер представляет собой водный буфер образца для электрофореза, содержащий от 0,5 до 1,5% додецилсульфата лития, от 55 до 85 мМ фосфата натрия и восстанавливающий агент, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН более 8. В одном 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.

[12] В другом варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер представляет собой водный буфер образца для электрофореза, содержащий от 0,5 до 1,5% додецилсульфата лития, от 45 до 85 мМ фосфата натрия и восстанавливающий агент, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН 8 или более. В одном варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 8. В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер содержит от 80 до 155 мМ дитиотреитола. В еще одном варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий буфер, содержащий 1,2% додецилсульфата лития, 60 мМ фосфата натрия и 80 мМ дитиотреитола.

[13] Буферы на основе HEPES также можно использовать с раскрытыми способами. В одном варианте осуществления изобретения предложен невосстанавливающий водный буфер для электрофореза 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, при этом водный буфер образца для электрофореза 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.

[14] В другом варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий водный буфер образца для электрофореза на основе HEPES, содержащий от 0,05 до 0,75% додецилсульфата лития, от 5 до 115 мМ хлорида натрия, от 5 до 115 мМ HEPES и восстанавливающий агент, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН более 7. В одном 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.

[15] В одном варианте осуществления изобретения предложен невосстанавливающий способ МСЕ для определения загрязняющих веществ или примесей в образце белкового лекарственного средства, включающий в себя этапы добавления образца белка к невосстанавливающему буферу, рассмотренному выше, с получением образца забуференного белкового лекарственного средства. Образец забуференного

белкового лекарственного средства нагревают до температуры от 65 до 85 °С в течение 5-15 минут с получением образца денатурированного забуференного белкового лекарственного средства. В одном варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до 70 °С в течение 10 мин.

[16] В другом варианте осуществления изобретения невосстанавливающий способ МСЕ для определения загрязняющих веществ или примесей в образце белкового лекарственного средства включает в себя этапы добавления образца белка к невосстанавливаемому буферу, рассмотренному выше, с получением образца забуференного белкового лекарственного средства. Образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до температуры от 50 до 72 °С в течение 5-15 минут с получением образца денатурированного забуференного белкового лекарственного средства. В альтернативном варианте образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до температуры от 45 до 75 °С в течение 5-15 минут с получением образца денатурированного забуференного белкового лекарственного средства. В одном варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до 60-65 °С в течение 10 мин. В другом варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до 63 °С в течение 10 мин. В другом варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до 60 °С в течение 10 мин.

[17] В некоторых вариантах осуществления изобретения образец белкового лекарственного средства смешивают с детектируемой меткой и нагревают при температуре от 30 до 40 °С в течение 20-40 минут или от 10 до 40 минут с получением образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства. В других вариантах осуществления изобретения образец белкового лекарственного средства смешивают с детектируемой меткой и нагревают при температуре от 30 до 40 °С в течение 15 минут с получением образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства. Детектируемая метка включает в себя, без ограничений, сложный эфир Duomics DY-631 NHS. В некоторых вариантах осуществления изобретения метку разводят очищенной водой MilliQ, а в других вариантах осуществления изобретения метку разводят в натрий-фосфатном буфере. В некоторых примерах детектируемую метку восстанавливают диметилсульфоксидом (ДМСО) с последующим разведением 200 мМ буфера на основе фосфата натрия, рН 7,2. Могут быть использованы и другие детектируемые метки, включая другие красители, флуорофоры, хромофоры, массовые метки, квантовые точки и т. п., а также те, что раскрыты в патенте США № 6,924,372. В одном варианте осуществления изобретения образец белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают до 35 °С в течение 30 минут. В другом варианте осуществления изобретения образец белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают до 35 °С в течение 15 минут. Избыток метки необязательно удаляют из образца, например, с помощью центробежного фильтра. В еще

одном варианте осуществления изобретения избыток метки не гасят. В еще одном варианте осуществления изобретения избыток метки не удаляют

[18] Денатурированный меченый продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, разводят и подвергают МСЕ для отделения разведенного образца белкового лекарственного средства на системе капиллярного электрофореза на микрочипах с получением электрофореграммы. В одном варианте осуществления изобретения конечная концентрация образца, начиная с 0,5 мг/мл, который затем вводят через микрочип, составляет 9 мкг/мл по отношению к МСЕ. В другом варианте осуществления изобретения конечная концентрация образца, начиная с 0,2 мг/мл, который затем вводят через микрочип, составляет 3,6 мкг/мл по отношению к МСЕ. Электрофореграмма содержит пики, соответствующие продукту, представляющему собой белковое лекарственное средство, и примесям. Способ завершается определением пиков на электрофореграмме, соответствующих продукту, представляющему собой белковое лекарственное средство, загрязняющим веществам и/или примесям.

[19] В другом варианте осуществления изобретения предложен способ восстановления МСЕ для определения загрязняющих веществ или примесей в образце белкового лекарственного средства. Способ начинается с добавления образца белка к любому из восстанавливающих буферов, описанных выше, с получением образца забуференного белкового лекарственного средства. Образец забуференного белкового лекарственного средства денатурируют путем нагревания образца забуференного белкового лекарственного средства до температуры от 65 до 85 °С, предпочтительно до 75 °С, в течение 10 минут с получением образца денатурированного белкового лекарственного средства. Образец белкового лекарственного средства смешивают с детектируемой меткой и нагревают при температуре от 30 до 40 °С в течение 20-40 минут с получением образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства. В одном варианте осуществления изобретения образец белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают до 35 °С в течение 30 минут.

[20] В других вариантах осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства денатурируют путем нагревания образца забуференного белкового лекарственного средства до 50-72 °С, предпочтительно до 60 °С, в течение 10 минут с получением образца денатурированного белкового лекарственного средства. Например, образец белкового лекарственного средства смешивают с детектируемой меткой и нагревают при температуре от 30 до 40 °С в течение 15 минут с получением образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства. В другом варианте осуществления изобретения образец белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают до 35 °С в течение 15 минут.

[21] Избыток метки необязательно удаляют из образца, например, с помощью центробежного фильтра. В еще одном варианте осуществления изобретения избыток метки не гасят. В еще одном варианте осуществления изобретения избыток метки не удаляют. Иллюстративная детектируемая метка включает в себя, без ограничений,

сложный эфир Duomics DY-631 NHS. Другие детектируемые метки, которые можно использовать, включают в себя другие красители, флуорофоры, хромофоры, массовые метки, квантовые точки и т. п., а также те, что раскрыты в патенте США № 6,924,372.

[22] В одном варианте осуществления изобретения установленный диапазон анализа для концентрации образца 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 анализу МСЕ на системе капиллярного электрофореза на микрочипах с получением электрофореграммы. В другом варианте осуществления изобретения установленный диапазон анализа для концентрации образца составляет от 0,2 мг/мл до 0,6 мг/мл, что соответствует конечной анализируемой концентрации от около 3,6 мкг/мл до 11 мкг/мл. Способ завершается определением пиков на электрофореграмме, соответствующих продукту, представляющему собой белковое лекарственное средство, загрязняющим веществам и/или примесям.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[23] На **Фиг. 1А** показана электрофореграмма типичного анализа невосстановленного образца.

[24] На **Фиг. 1В** показана электрофореграмма типичного анализа восстановленного образца. Ось X представляет время в минутах, а ось Y представляет относительные единицы флуоресценции (RFU). Увеличение времени миграции соответствует увеличению размера белка.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

[25] Использование терминов в единственном числе и аналогичных референтов в контексте описания заявленного в настоящем документе изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее как единственное, так и множественное число, если иное не указано в данном документе или явно не противоречит контексту.

[26] Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для использования в качестве сокращенного метода индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если иное не указано в данном документе, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было отдельно изложено в данном документе.

[27] Использование термина «около» предназначено для описания значений либо выше, либо ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 10%; в других вариантах осуществления изобретения значения могут находиться в диапазоне значений либо выше, либо ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 5%; в других вариантах осуществления изобретения значения могут находиться в диапазоне значений либо выше, либо ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 2%; в других вариантах осуществления изобретения значения могут находиться в диапазоне значений либо выше, либо ниже указанного значения в диапазоне прибл. +/- 1%. Предшествующие диапазоны

поясняются контекстом, и никаких дополнительных ограничений не подразумевается. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Использование любых возможных примеров или иллюстративных формулировок (например, «таких как»), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не должны быть истолкованы как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для применения изобретения на практике.

[28] «Белок» относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидной связью. Белок включает в себя полипептиды и пептиды и может также включать в себя такие модификации, как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксихлорирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксиглирование и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на белковой основе, а белки включают в себя, среди прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки производятся различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных способов культивирования клеток и обычно вводятся в клетку методами генной инженерии (например, такими как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, лишенная интронов последовательность и т. д.), где они могут находиться в виде эписомы или могут быть интегрированы в геном клетки.

[29] «Антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную 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 имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гиперпеременности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), со вставками более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин «антитело» также включает биспецифическое антитело, которое включает

гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с несколькими разными эпитопами. Биспецифические антитела в основном описаны в патенте США № 8,586,713.

[30] «Fc-слитые белки» содержат часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые в ином случае не встречаются вместе в природе. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полученных из антител полипептидов (включая домен Fc), было описано, например, в 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). «Рецепторные Fc-слитые белки» содержат один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления изобретения содержит шарнирную область, за которой следуют домены CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-слитый белок содержит две или более отдельных рецепторных цепей, которые связываются с одним или более лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 или ловушка VEGF.

[31] Термин «МСЕ» или «капиллярный электрофорез на микрочипах» относится к разделению аналитов с помощью капиллярного электрофореза (CE) на основе микрочипов.

II. Анализы и буферы МСЕ

[32] Предложены способы анализа аналитов в образце белкового лекарственного средства. Белковые лекарственные средства включают в себя, без ограничений, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, слитые белки и рекомбинантные белки. В анализах используют методы МСЕ для разделения, определения и количественного определения белкового продукта и примесей в белковом продукте. Примеси включают в себя, без ограничений, белковые агрегаты, белковые фрагменты, белковые мультимеры и загрязняющие вещества при анализе. Также предложены восстанавливающие и невосстанавливающие буферы.

[33] Капиллярный электрофорез на микрочипах (МСЕ) обеспечивает анализ чистоты белка и примесей, подходящий для тестирования в процессе производства, выпуска партий и индикации стабильности. Образцы белка, такие как казирививаиб и имдевимаиб, были получены путем денатурации образца посредством нагревания и добавления додецилсульфата лития (LDS) либо с алкилирующим агентом (невосстановленным), либо с восстанавливающим агентом (восстановленным). Не желая ограничиваться теорией, в результате получают линейные отрицательно заряженные полипептидные цепи белка-LDS, которые затем инкубируют с красителем на основе сложного аминного эфира для ковалентного мечения любых свободных аминок групп. Меченые образцы можно вводить в микрочип, где приложение тока разделяет компоненты образца в соответствии с соотношением массы к заряду. Обнаружение можно осуществлять с помощью лазерно-индуцированной флуоресценции с получением

электрофореграммы. Анализ электрофореграммы позволяет определить относительную чистоту образца по сравнению с присутствующими примесями.

А. Буферы

1. Невосстанавливающие буферы

[34] В одном варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий водный буфер образца для электрофореза, содержащий от 155 до 200 мМ алкилирующего агента, например, 2-йодацетамида; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 60 до 95 мМ фосфата натрия, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН менее 7. В одном 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.

[35] В другом варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий водный буфер образца для электрофореза, содержащий от 155 до 200 мМ алкилирующего агента; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 60 до 95 мМ фосфата натрия, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН менее или равный 8. В другом варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 8. В другом варианте осуществления изобретения водный буфер содержит 200 мМ 2-йодацетамида, 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия.

[36] В другом варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий водный буфер образца для электрофореза, содержащий от 155 до 200 мМ алкилирующего агента; от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и от 60 до 95 мМ фосфата натрия, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН менее 8. В другом варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 6. В другом варианте осуществления изобретения водный буфер содержит 200 мМ 2-йодацетамида, 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия.

2. Восстанавливающие буферы

[37] Также предлагается восстанавливающий буфер. В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер представляет собой водный буфер образца для электрофореза, содержащий от 0,5 до 1,5% додецилсульфата лития, от 65 до 95 мМ фосфата натрия и восстанавливающий агент, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН более 8. В другом варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер содержит от 0,5 до 1,5% додецилсульфата лития, от 45 до 95 мМ фосфата натрия и восстанавливающий агент, а водный буфер образца для электрофореза имеет рН 8 или более. В одном варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 9. В другом варианте осуществления изобретения рН буфера составляет 8.

[38] Восстанавливающие агенты известны в данной области техники. Иллюстративные восстанавливающие агенты включают в себя, без ограничений, дитиотреитол (ДТТ, CAS 3483-12-3), бета-меркаптоэтанол (ВМЕ, 2ВМЕ, 2-МЕ, b-mer,

CAS 60-24-2), 2-аминоэтантол (2 -MEA-HCl, также называемый цистеамином-HCl, CAS 156-57-0), гидрохлорид трис (2-карбоксиитил) фосфина (TCBP, CAS 5961-85-3), гидрохлорид цистеина (Cys-HCl, CAS 52-89-1) или натриевую соль 2-меркаптоэтансульфонокислоты (MESNA). В данной области техники известны другие способы восстановления белковых связей, такие как колонка с иммобилизованным восстановителем, которая содержит смолу, на которой иммобилизован восстанавливающий агент на основе тиола, чтобы обеспечить твердофазное восстановление пептидных и белковых дисульфидных связей. Также предусмотрены дополнительные восстанавливающие агенты, подходящие для расщепления дисульфидных связей.

[39] В одном варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер содержит от 135 до 155 мМ дитиотреитола. В другом варианте осуществления изобретения восстанавливающий буфер содержит от 80 до 155 мМ дитиотреитола.

[40] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий буфер, содержащий 0,69% додецилсульфата лития, 69 мМ фосфата натрия и 142 мМ дитиотреитола или 1,2% додецилсульфата лития, 60 мМ фосфата натрия и 80 мМ дитиотреитола.

3. Невосстанавливающие буферы на основе HEPES

[41] Буферы на основе HEPES также можно использовать с раскрытыми способами. В одном варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий водный буфер для электрофореза 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, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет pH менее 9. В одном варианте осуществления изобретения pH 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

[42] В другом варианте осуществления изобретения предложен восстанавливающий водный буфер образца для электрофореза на основе HEPES, содержащий от 0,05 до 0,75% додецилсульфата лития, от 5 до 115 мМ хлорида натрия, от 5 до 115 мМ HEPES и восстанавливающий агент, при этом водный буфер образца для электрофореза имеет pH более 7. В одном варианте осуществления изобретения pH 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. Невосстанавливающие анализы

[43] В одном варианте осуществления изобретения предложен невосстанавливающий способ МСЕ для определения загрязняющих веществ или примесей в образце белкового лекарственного средства, включающий в себя этапы добавления образца белка к невосстанавливающему буферу, рассмотренному выше, с получением образца забуференного белкового лекарственного средства. Образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до температуры от 50 до 85 °С в течение 5-15 минут с получением образца денатурированного забуференного белкового лекарственного средства. В одном варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до 75 °С в течение 10 мин. В другом варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до температуры от 45 до 75 °С в течение 5-15 минут с получением образца денатурированного забуференного белкового лекарственного средства. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до 60 °С в течение 10 мин. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до 63 °С в течение 10 мин.

[44] Детектируемую метку получают, в соответствии с рекомендациями поставщика, в диметилсульфоксиде (ДМСО). Последующие разведения получают, в соответствии с рекомендациями поставщика, в MilliQ. В других вариантах осуществления изобретения метку получают путем разведения 200 мМ фосфата натрия, рН 7,2. В некоторых вариантах осуществления изобретения метку разводят до 5 мкМ раствора. В других вариантах осуществления изобретения метку разводят до 16 мкМ раствора. Затем разведенную метку добавляют к образцу денатурированного забуференного белкового лекарственного средства и нагревают при температуре от 30 до 40 °С в течение 10-40 минут с получением образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства. Затем в другом варианте осуществления изобретения к образцу денатурированного забуференного белкового лекарственного средства добавляют детектируемую метку и нагревают при температуре от 30 до 40 °С в течение 15 минут с получением образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства. В одном варианте осуществления изобретения образец денатурированного белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают до 35 °С в течение 30 минут. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения образец денатурированного белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают до 35 °С в течение 15 минут. Избыток метки необязательно удаляют из образца, например, с помощью центробежного фильтра. В еще одном варианте осуществления изобретения избыток метки не гасят. В еще одном варианте осуществления изобретения избыток метки не удаляют.

[45] Предпочтительная детектируемая метка включает в себя, без ограничений, сложный эфир Duomics DY-631 NHS. Могут быть использованы и другие детектируемые

метки, включая другие красители, флуорофоры, хромофоры, массовые метки, квантовые точки и т. п., а также те, что раскрыты в патенте США № 6,924,372.

[46] Денатурированный меченый продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, разводят и подвергают МСЕ для отделения разведенного образца белкового лекарственного средства на системе капиллярного электрофореза на микрочипах с получением электрофореграммы. В одном варианте осуществления изобретения конечная концентрация образца, начиная с 0,5 мг/мл, который затем вводят через микрочип, составляет 9 мкг/мл по отношению к МСЕ. В другом варианте осуществления изобретения исходная концентрация образца составляет 0,2 мг/мл. Электрофореграмма содержит пики, соответствующие продукту, представляющему собой белковое лекарственное средство, и примесям. Способ завершается определением пиков на электрофореграмме, соответствующих загрязняющим веществам или примесям.

2. Восстанавливающие анализы

[47] В другом варианте осуществления изобретения предложен способ восстановления МСЕ для определения загрязняющих веществ или примесей в образце белкового лекарственного средства. Способ начинается с добавления образца белкового лекарственного средства к любому из восстанавливающих буферов, описанных выше, с получением образца забуференного белкового лекарственного средства. Образец забуференного белкового лекарственного средства денатурируют путем нагревания образца забуференного белкового лекарственного средства до температуры от 65 до 85 °С, предпочтительно до 75 °С, в течение 10 минут с получением образца денатурированного белкового лекарственного средства. В другом варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства денатурируют путем нагревания образца забуференного белкового лекарственного средства до температуры от 50 до 72 °С или от 45 до 75 °С, или предпочтительно до 60 °С в течение 10 минут с получением образца денатурированного белкового лекарственного средства. В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретения образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают до 63 °С в течение 10 мин. Температура, необходимая для денатурации образца целевого белкового лекарственного средства, может быть изменена в соответствии со структурой целевого образца белкового лекарственного средства.

[48] Затем образец белкового лекарственного средства с добавленной меткой нагревают при температуре от 30 до 40 °С в течение 20-40 минут, или 10-20, или 10-40 минут с получением образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства. В одном варианте осуществления изобретения образец белкового лекарственного продукта с добавленной меткой нагревают до 35 °С в течение 30 минут. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения образец белкового лекарственного продукта с добавленной меткой нагревают до 35 °С в течение 15 минут. Избыток метки необязательно удаляют из образца, например, с помощью центробежного фильтра. В еще одном варианте осуществления изобретения избыток метки не гасят. В

еще одном варианте осуществления изобретения избыток метки не удаляют. Предпочтительная детектируемая метка включает в себя, без ограничений, сложный эфир Duomics DY-631 NHS. Другие детектируемые метки, которые можно использовать, включают в себя другие красители, флуорофоры, хромофоры, массовые метки, квантовые точки и т. п., а также те, что раскрыты в патенте США № 6,924,372.

[49] В одном варианте осуществления изобретения установленный диапазон анализа для концентрации образца 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 анализу МСЕ на системе капиллярного электрофореза на микрочипах с получением электрофореграммы. В другом варианте осуществления изобретения установленный диапазон анализа для концентрации образца составляет от 0,2 мг/мл до 0,6 мг/мл, что соответствует конечной анализируемой концентрации от около 3,6 мкг/мл до 11 мкг/мл, которую подвергают анализу МСЕ на системе капиллярного электрофореза на микрочипах с получением электрофореграммы. Способ завершается определением пиков на электрофореграмме, соответствующих продукту, представляющему собой белковое лекарственное средство, загрязняющим веществам и/или примесям.

С. Контрольно-измерительные приборы

[50] Контрольно-измерительные приборы для проведения раскрытых анализов МСЕ имеются в продаже. В одном варианте осуществления изобретения раскрытые анализы МСЕ проводят с использованием LabChip GXII или LabChip GXII Touch HT и HT Protein Express Chip LabChip®.

III. Представляющие интерес белки

[51] Представляющий интерес белок, например продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, анализируемый с помощью раскрытых анализов и реагентов МСЕ, может представлять собой любой представляющий интерес белок, подходящий для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках, и может быть использован в предлагаемых сконструированных системах клеток-хозяев. Например, представляющий интерес белок включает в себя, без ограничений, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-слитый белок 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 одной субъединицы, или сложные белки из нескольких субъединиц, содержащие две или более субъединиц. Представляющий интерес белок может представлять собой биофармацевтический продукт, пищевую добавку или консервант, или любой белковый продукт, подлежащий очистке и стандартам качества.

[52] В некоторых вариантах осуществления изобретения продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство (представляющий интерес белок) представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело,

моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антигенсвязывающего 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.

[53] Варианты осуществления изобретения можно использовать с любыми известными терапевтическими антителами. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело можно выбрать из группы, состоящей из антитела к запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела к PD1, как описано в опубликованной заявке на патент США № US2015/0203579A1), антитела к лиганду запрограммированной гибели клеток 1 (например, антитела к PD-L1, как описано в опубликованной заявке на патент США № US2015/0203580A1), антитела к Dll4 и антитела к ангиопоэтину-2 (например, антитела к ANG2, как описано в патенте США № 9,402,898), антитела к подобному ангиопоэтину белку 3 (например, антитела к AngPt13, как описано в патенте США № 9,018,356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитела к PDGFR, как описано в патенте США № 9,265,827), антитела к Erb3, антитела к рецептору пролактина (например, антитела к PRLR, как описано в патенте США № 9,302,015), антитела к комплементу 5 (например, антитела к C5, как описано в опубликованной заявке на патент США № US2015/0313194A1), антитела к TNF, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитела к EGFR, как описано в патенте США № 9,132,192, или антитела к EGFRvIII, как описано в опубликованной заявке на патент США № US2015/0259423A1), антитела к протеиновой конвертазе субтилизин/кексин 9 (например, антитела к PCSK9, как описано в патенте США № 8,062,640 и патенте США № 9,540,449), антитела к фактору роста и дифференцировки 8 (например, антитела к GDF8, также известного как антитело к миостатину, как описано в патентах США №№ 8,871,209 или 9,260,515), анти-глюкагонового рецептора (например, антитела к GCGR, как описано в опубликованных заявках на патент США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитела к IL4R, как описано в опубликованной заявке на патент США № US 2014/0271681A1 или патентах США №№ 8,735,095 или 8,945,559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, антитела к IL6R, как описано в патентах США №№ 7,582,298, 8,043,617 или 9,173,880), антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к

интерлейкину 33 (например, антитела к IL33, как описано в патентах США №№ 9,453,072 или 9,637,535), антитела к респираторно-синцитиального вируса (например, антитела к RSV, как описано в опубликованной заявке на патент США № 9,447,173), антикластера дифференцировки 3 (например, антитела к CD3, как описано в патентах США №№ 9,447,173 и 9,447,173 и в заявке США № 62/222,605) антикластера дифференцировки 20 (например, антитела к CD20, как описано в патентах США №№ 9,657,102 и US20150266966A1 и в патенте США № 7,879,984), антитела к CD19, антитела к CD28, антикластера дифференциации 48 (например, антитела к CD48, как описано в патенте США № 9,228,014), антитела к Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9,079,948), вируса против ближневосточного респираторного синдрома (например, антитела к MERS, как описано в опубликованной заявке на патент США № US2015/0337029A1), антитела к вирусу Эбола (например, как описано в опубликованной заявке на патент США № US2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к гену активации лимфоцитов 3 (например, антитела к LAG3 или антитела к CD223), антитела к фактору роста нервной ткани (например, антитела к NGF, как описано в опубликованной заявке на патент США № US2016/0017029 и патентах США №№ 8,309,088 и 9,353,176) и антитела к белку Y. В некоторых вариантах осуществления изобретения биспецифическое антитело может быть выбран из группы, состоящей из биспецифического антитела к CD3 x CD20 (как описано в опубликованных заявках на патент США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела к CD3 x муцину 16 (например, биспецифического антитела к CD3 x Muc16) и биспецифического антитела к CD3 x специфическому к простате мембранному антигену (например, биспецифического антитела к CD3 x PSMA). В некоторых вариантах осуществления изобретения представляющий интерес белок может быть выбран из группы, состоящей из казиривимаба, имдевимаба, равулизумаба-cwvz, абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-atto, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белимумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлотоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтансинеалирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гуселькумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-abda, инфликсимаба-dyub, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксикакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

[54] В одном варианте осуществления изобретения представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой

домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, связанного с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следуют домены CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления изобретения рецепторный Fc-слитый белок содержит две или более разных цепей рецептора, которые связываются с одним лигандом или несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лиганд-связывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6,927,044, или ловушку VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитого с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7,087,411 и 7,279,159). В других вариантах осуществления изобретения Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или более антигенсвязывающих доменов, таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи, антитела, связанного с Fc-фрагментом.

IV. Клеточная культура

[55] Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, анализируемое с помощью раскрытых анализов и реагентов МСЕ, получают в клеточных культурах. Клеточные культуры могут представлять собой «периодическую клеточную культуру с периодической подпиткой» или «культуру с периодической подпиткой», которая относится к периодической культуре, в которой клетки и среда для культивирования первоначально подаются в культуральный сосуд, а дополнительные культуральные питательные вещества медленно подаются дискретными приращениями, к культуре во время культивирования, с периодическим сбором клеток и/или продукта или без него перед прекращением культивирования. Культура с периодической подпиткой включает «полунепрерывную культуру с периодической подпиткой», когда периодически удаляют всю культуру (которая может содержать клетки и среду) и заменяют свежей средой. Культура с периодической подпиткой отличается от просто «периодической культуры», в которой все компоненты для культивирования клеток (включая клетки животных и все культуральные питательные вещества) вносят в культуральный сосуд в начале процесса культивирования в периодической культуре. Культура с периодической подпиткой может отличаться от «перфузионной культуры» тем, что супернатант не удаляют из культурального сосуда во время стандартного процесса с периодической подпиткой, тогда как при перфузионном культивировании клетки удерживаются в культуре, например, путем фильтрации и среду для культивирования непрерывно или периодически вводят в культуральный сосуд и удаляют из него. Тем не менее, предусмотрено изъятие образцов в целях тестирования во время клеточного культивирования с периодической подпиткой. Процесс с периодической подпиткой

продолжается до тех пор, пока не будет определено, что достигнуты максимальный рабочий объем и/или получение белка, после чего белок собирают.

[56] Клеточная культура может представлять собой «непрерывную клеточную культуру», которая представляет собой метод, используемый для непрерывного выращивания клеток, обычно в определенной фазе роста. Например, если требуется постоянная подача клеток или требуется получение определенного представляющего интерес белка, для клеточной культуры может потребоваться поддержание в конкретной фазе роста. Таким образом, условия необходимо постоянно контролировать и соответственно регулировать с целью поддержания клеток в этой конкретной фазе.

[57] 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, как правило, обеспечивает необходимые питательные вещества для ускорения 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, следовые элементы, источники энергии, липиды, витамины и т. д. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые поставляют сырье, поддерживающее рост клеток. Среда может содержать дрожжевые или соевые экстракты вместо экстрактов животного происхождения. Химически определенная среда относится к среде для культивирования клеток, в которой известны все химические компоненты (т. е. они имеют известную химическую структуру). Химически определенная среда совсем не содержит компонентов животного происхождения, таких как пептоны сыворотки или животного происхождения. В одном варианте осуществления изобретения среда представляет собой химически определенную среду.

[58] Раствор также может содержать компоненты, которые усиливают рост и/или выживаемость выше минимального уровня, включая гормоны и факторы роста. Раствор может быть составлен с рН и концентрацией соли, оптимальными для выживания и пролиферации конкретной культивируемой клетки.

[59] «Клеточная линия» относится к клетке или клетками, которые получены из конкретной линии дифференцировки посредством серийного пассирования или субкультивирования клеток. Термин «клетки» используют взаимозаменяемо с термином «клеточная популяция».

[60] Термин «клетка» включает любую клетку, которая подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариотов и эукариотов, такие как бактериальные клетки, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки животных, отличных от человека, клетки птиц, клетки насекомых, дрожжевые клетки или слияния клеток, таких как, например, гибридомы или квадромы. В определенных вариантах осуществления изобретения клетка представляет

собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления изобретения клетка может быть выбрана из следующих клеток: клетка яичника китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетка сетчатки, Vero, CV1, почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцит, например Jurkat (Т-лимфоцит) или Дауди (В-лимфоцит), A431 (эпидермальная), U937, 3T3, L-клетка, клетка C127, SP2/0, NS-0, клетка ММТ, стволовая клетка, опухолевая клетка и клеточная линия, полученная 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

[61] В одном варианте осуществления изобретения предложен набор, содержащий один или более раскрытых буферов или ингредиентов с получением раскрытых буферов. Набор может содержать контейнер для буферов или ингредиентов. Буферы могут находиться в растворе или в лиофилизированной форме. Набор необязательно также содержит второй контейнер, содержащий разбавитель или раствор для восстановления лиофилизированного состава; и необязательно инструкции по применению раствора или восстановлению и/или использованию лиофилизированных буферов или порошкообразных ингредиентов.

[62] Набор может дополнительно содержать дополнительные реагенты, необходимые для проведения раскрытых анализов МСЕ, включающих одно или более из буфера, разбавителя и фильтра. Буфер и реагенты могут содержаться в бутылке, флаконе или контрольной пробирке.

[63] Следующие примеры не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают собственными изобретениями.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: анализ МСЕ для анализа чистоты и примесей терапевтических белков.

Способы и материалы:

Материалы:

[64] Для капиллярного электрофоретического разделения и сбора данных использовали LabChip GXII или LabChip GXII Touch HT и HT Protein Express Chip LabChip® (Perkin Elmer). Для анализа МСЕ использовали невосстанавливающий и восстанавливающий денатурирующие буферы, раскрытые выше.

Способы:

[65] Капиллярный электрофорез на микрочипах (МСЕ) обеспечивает анализ чистоты белка и примесей, подходящий для тестирования в процессе производства,

выпуска партий и индикации стабильности. Образцы белка казирививаба и имдевимаба были получены путем денатурации образца посредством нагревания и добавления додецилсульфата лития (LDS) либо с алкилирующим (невосстановленным), либо с восстанавливающим агентом (восстановленным). Затем полученные образцы инкубировали с красителем на основе сложного аминного эфира для ковалентного мечения любых свободных аминокрупп. Меченые образцы вводили в микрочип, где приложение тока разделяло компоненты образца по размеру (от низкой до высокой молекулярной массы). Обнаружение осуществляли с помощью лазерно-индуцированной флуоресценции с получением электрофореграммы. Анализ электрофореграммы позволяло определить относительную чистоту образца по сравнению с присутствующими примесями.

[66] В таблице 1 приведена процедура рабочего процесса получения образца для первого анализа МСЕ. Вкратце, образцы белка разводили до 0,5 мг/мл. 1 мкл либо невосстанавливающего (NR), либо восстанавливающего (R) денатурирующего буфера и 4 мкл разведенного образца добавляли в 96-луночный планшет. Образец перемешивали, центрифугировали и нагревали в течение 10 минут при температуре, указанной для продукта, как правило, 75 °С. Затем образцы метили 5 мкМ имеющегося в продаже красителя (например, сложного эфира Dyomics DY-631 NHS, также называемого красителем PICO). Образцы смешивали, центрифугировали, а затем нагревали при 35 °С в течение 30 минут. Затем меченый образец разводили 105 мкл разведенного останавливающего раствора. Образцы разделяли с помощью LabChip GXII или LabChip GXII Touch HT.

Таблица 1. Способ получения образцов для первого анализа МСЕ.

Получение образцов	
NR	R
4 мкл 0,5 мг/мл образца	4 мкл 0,5 мг/мл образца
1 мкл буфера NR	1 мкл буфера R
Перемешивание, центрифугирование, нагревание при указанной температуре в течение 10 минут	
Мечение образца	
5 мкл денатурированного образца	
5 мкл 5 мкМ красителя PICO	
Перемешивание, центрифугирование, нагревание при 35 °С в течение 30 минут	
Окончательное разведение	
5 мкл меченого образца	
105 мкл разведенного останавливающего раствора	
Способ разделения	
HT PICO Белковый экспресс 200	

[67] В таблице 2 приведена процедура рабочего процесса получения образца для второго анализа МСЕ. Вкратце, образцы белка разводили до 0,5 или 2 мг/мл. 10 мкл либо невосстанавливающего (NR), либо восстанавливающего (R) денатурирующего буфера и 40 мкл разведенного образца добавляли в 96-луночный планшет. Образец перемешивали,

центрифугировали и нагревали в течение 10 минут при температуре, указанной для продукта, как правило, 60 °С. Затем образцы метили 16 мкМ имеющегося в продаже красителя (например, сложного эфира Dyomics DY-631 NHS). Образцы смешивали, центрифугировали, а затем нагревали при 35 °С в течение 15 минут. Затем меченый образец разводили 105 мкл разведенного останавливающего раствора или разведенного раствора. Образцы разделяли с помощью LabChip GXII или LabChip GXII Touch HT.

Пример 1А: невосстанавливающий буфер

[68] Следовали общему приготовлению, представленному в таблице 1, с использованием на этапе подготовки образца невосстанавливающего водного буфера образца для электрофореза, который содержал 166 мМ 2-йодацетамида, 0,81% додецилсульфата лития и 81 мМ фосфата натрия и имел рН 6. Образец нагревали при 75 °С в течение 10 минут. На этапе мечения образца использовали раствор красителя с концентрацией 5 мкМ. На этапе окончательного разведения использовали 105 мкл разбавленного останавливающего раствора.

Пример 1В: восстанавливающий буфер

[69] Следовали общему приготовлению, представленному в таблице 1, с использованием на этапе подготовки образца восстанавливающего водного буфера образца для электрофореза, который содержал 0,69% додецилсульфата лития, 69 мМ фосфата натрия и 142 мМ дитиотреитола и имел рН 9. Образец нагревали при 75 °С в течение 10 минут. На этапе мечения образца использовали раствор красителя с концентрацией 5 мкМ. На этапе окончательного разведения использовали 105 мкл разбавленного останавливающего раствора.

Таблица 2. Общий способ подготовки образцов для второго анализа МСЕ.

Получение образцов	
NR	R
40 мкл 0,2 мг/мл образца	40 мкл 0,2 мг/мл образца
10 мкл буфера NR	10 мкл буфера R
Перемешивание, центрифугирование, нагревание при указанной температуре в течение 10 минут	
Мечение образца	
5 мкл денатурированного образца	
16 мкл 16 мкМ красителя PICO	
Перемешивание, центрифугирование, нагревание при 35 °С в течение 15 минут	
Окончательное разведение	
5 мкл меченого образца	
105 мкл разбавленного останавливающего раствора или разбавленного раствора	
Способ разделения	
HT PICO Белковый экспресс 200	

Буферы

[70] Получали исходные растворы 200 мМ моногидрата одноосновного фосфата натрия, 200 мМ гепатгидрата двухосновного фосфата натрия и 10% додецилсульфата

лития (LDS). В альтернативном варианте использовали коммерчески полученный натрий-фосфатный буфер с pH 8.

[71] С использованием исходных растворов и воды Milli-Q® получали растворы 100 мМ фосфата натрия, 1% LDS, pH 6, и 100 мМ фосфата натрия, 1% LDS, pH 9.

[72] Альтернативные буферы получали с использованием исходных растворов и воды Milli-Q, включая растворы 100 мМ фосфата натрия, 2% LDS, pH 6, и 100 мМ фосфата натрия, 2% LDS, pH 8.

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

[74] Альтернативный восстанавливающий буфер получали путем добавления 800 мкл 1М йодацетамида (IAM) (полученного свежим в воде Milli-Q®) и 1200 мкл 100 мМ фосфата натрия, 2% LDS, pH 8. Конечные концентрации составляли 200 мМ 2-йодацетамида, 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия.

[75] Еще один восстанавливающий буфер получали путем добавления 800 мкл 1М йодацетамида (IAM) (полученного свежим в воде Milli-Q®) и 1200 мкл 100 мМ фосфата натрия, 2% LDS, pH 6. Конечные концентрации составляли 200 мМ 2-йодацетамида, 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия.

[76] Восстанавливающий буфер получали путем добавления 68 мкл 10х восстанавливающего агента (500 мМ дитиотреитола (DTT), 166 мкл 100 мМ фосфата натрия, 1% LDS, pH 9, и 6 мкл воды Milli-Q®. Конечные концентрации составляли 0,69% додецилсульфата лития; 69 мМ фосфата натрия и 142 мМ дитиотреитола.

[77] Альтернативный восстанавливающий буфер получали путем добавления 320 мкл 10х восстанавливающего агента (500 мМ дитиотреитола (DTT), 1200 мкл 100 мМ фосфата натрия, 2% LDS, pH 8, и 480 мкл воды Milli-Q®. Конечные концентрации составляли 1,2% додецилсульфата лития; 60 мМ фосфата натрия и 80 мМ дитиотреитола.

Пример 2А: восстанавливающий буфер

[78] Следовали общему приготовлению, представленному в таблице 2, с использованием на этапе подготовки образца восстанавливающего водного буфера образца для электрофореза, который содержал 200 мМ 2-йодацетамида, 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия и имел pH 8. Образец нагревали при 60 °С в течение 10 минут. На этапе мечения образца использовали раствор красителя с концентрацией 16 мкМ. На этапе окончательного разведения использовали 105 мкл разбавленного останавливающего раствора.

Пример 2В: восстанавливающий буфер

[79] Следовали общему приготовлению, представленному в таблице 2, с использованием на этапе подготовки образца восстанавливающего водного буфера образца для электрофореза, который содержал 1,2% додецилсульфата лития, 60 мМ фосфата натрия и 80 мМ дитиотреитола и имел pH 8. Образец нагревали при 60 °С в

течение 10 минут. На этапе мечения образца использовали раствор красителя с концентрацией 16 мкМ. На этапе окончательного разведения использовали 105 мкл разбавленного останавливающего раствора.

Пример 2C: невозстанавливающий буфер, негасящий

[80] Следовали общему приготовлению, представленному в таблице 2, с использованием на этапе подготовки образца невозстанавливающего водного буфера образца для электрофореза, который содержал 200 мМ 2-йодацетамида, 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия и имел рН 6. Образец нагревали при 63 °С в течение 10 минут. На этапе мечения образца использовали раствор красителя с концентрацией 16 мкМ. На этапе окончательного разведения использовали 105 мкл разбавленного раствора.

Пример 2D: восстанавливающий буфер, негасящий

[81] Следовали общему приготовлению, представленному в таблице 2, с использованием на этапе подготовки образца восстанавливающего водного буфера образца для электрофореза, который содержал 1,2% додецилсульфата лития, 60 мМ фосфата натрия и 80 мМ дитиотреитола и имел рН 8. Образец нагревали при 63 °С в течение 10 минут. На этапе мечения образца использовали раствор красителя с концентрацией 16 мкМ. На этапе окончательного разведения использовали 105 мкл разбавленного раствора.

Результаты:

[82] Капиллярный электрофорез на микрочипах (МСЕ) обеспечивает существенное сокращение отрезков времени анализа проб, сохраняя при этом стандарты производительности и воспроизводимости, необходимые для анализа КК. Анализ МСЕ был разработан с использованием невозстановленного и восстановленного денатурирующих буферов, раскрытых в настоящем документе. На Фиг. 1А-1В показаны репрезентативные электрофореграммы белка в невозстановленных образцах и восстановленных образцах из первого анализа МСЕ. На Фиг. 1А показана электрофореграмма невозстановленного анализа. Основной пик (ОП) при 0,426 соответствует основному антителу, а меченые пики низкой молекулярной массы (LMW) соответствуют фрагментам антитела. Хотя в данном примере пик, соответствующий одному или более высокомолекулярным фрагментам, отсутствует, в некоторых случаях он присутствует. На Фиг. 1В показана электрофореграмма восстановленного анализа. Пики, соответствующие легкой цепи (LC), тяжелой цепи и негликозилированной тяжелой цепи (NGHC), низкомолекулярному (LMW) и высокомолекулярному (HMW) фрагментам антител, помечены соответствующим образом. Следует отметить, что разные продукты могут иметь разные электрофореграммы и, следовательно, разные условные обозначения для мечения.

[83] Хотя в вышеприведенном описании настоящее изобретение было описано в отношении его определенных вариантов осуществления изобретения, и многие подробности были изложены с целью иллюстрации, для специалистов в данной области

техники будет очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты осуществления изобретения и что некоторые подробности, описанные в данном документе, могут быть значительно изменены без отступления от основных принципов изобретения.

[84] Настоящее изобретение может быть реализовано в других конкретных формах без отступления от его сущности или существенных признаков, и, соответственно, в смысле указания объема изобретения должна быть сделана ссылка на приложенную формулу изобретения, а не на вышеприведенное описание.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Водный буфер образца для электрофореза, содержащий:
от 155 до 200 мМ 2-йодацетамида;
от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития; и
от 60 до 95 мМ фосфата натрия,
при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН меньше или равный 8.
2. Водный буфер по п. 1, отличающийся тем, что рН составляет 6.
3. Водный буфер по п. 1, содержащий 200 мМ 2-йодацетамида, 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия.
4. Водный буфер образца для электрофореза, содержащий:
165,9 мМ 2-йодацетамида,
0,81% додецилсульфата лития, и
81 мМ фосфата натрия,
при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН 6,0.
5. Водный буфер образца для электрофореза, содержащий:
200 мМ 2-йодацетамида,
1,2% додецилсульфата лития, и
60 мМ фосфата натрия,
при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН 6,0.
6. Водный буфер образца для электрофореза, содержащий:
200 мМ 2-йодацетамида,
1,2% додецилсульфата лития, и
60 мМ фосфата натрия,
при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН 8,0.
7. Водный буфер образца для электрофореза, содержащий:
от 0,50 до 1,5% додецилсульфата лития;
от 45 до 75 мМ фосфата натрия,
от 80 до 155 мМ дитиотреитола,
при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН 8 или выше.
8. Водный буфер по п. 7, отличающийся тем, что рН составляет 8.
9. Водный буфер по п. 7, отличающийся тем, что рН составляет 9.
10. Водный буфер по п. 8, содержащий 80 мМ дитиотреитола.
11. Водный буфер по п. 8, содержащий 142 мМ дитиотреитола.
12. Водный буфер по п. 7, дополнительно содержащий 1,2% додецилсульфата лития и 60 мМ фосфата натрия.
13. Водный буфер образца для электрофореза, состоящий из:
0,69% додецилсульфата лития;
69 мМ фосфата натрия, и
от 80 до 155 мМ дитиотреитола,
при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН 9,0.

14. Водный буфер образца для электрофореза, состоящий из:

1,2% додецилсульфата лития;

60 мМ фосфата натрия, и

80 мМ дитиотреитола,

при этом водный буфер образца для электрофореза имеет рН 8,0.

15. Способ определения загрязняющих веществ или примесей в образце белкового лекарственного средства, включающий этапы:

добавления образца белкового лекарственного средства к буферу по п. 1 с получением образца забуференного белкового лекарственного средства;

нагревания образца забуференного белкового лекарственного средства до температуры от 45 до 75 °С в течение 5-15 минут с получением образца денатурированного забуференного белкового лекарственного средства;

добавления детектируемой метки к образцу денатурированного забуференного белкового лекарственного средства и нагревания его при температуре от 30 до 40 °С в течение 10-40 минут с получением образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства;

разведения образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства и подвергания его МСЕ для отделения разведенного образца белкового лекарственного средства на системе капиллярного электрофореза на микрочипах с получением электрофореграммы; и

определения пиков на электрофореграмме, соответствующих белковому лекарственному средству, загрязняющим веществам и/или примесям.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают при 60°С в течение 10 мин.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что образец меченого белкового лекарственного средства нагревают при 35 °С в течение 15 минут.

18. Способ по п. 15, отличающийся тем, что разведенный образец белкового лекарственного средства составляет 3,6 мкг/мл.

19. Способ определения загрязняющих веществ или примесей в образце белкового лекарственного средства, включающий этапы:

добавления образца белка к буферу по п. 5 с получением образца забуференного белкового лекарственного средства;

нагревания образца забуференного белкового лекарственного средства до температуры от 45 до 75 °С в течение 5-15 минут с получением образца денатурированного белкового лекарственного средства;

добавления детектируемой метки к образцу денатурированного белкового лекарственного средства и нагревания его при температуре от 30 до 40 °С в течение 10-40 минут с получением образца денатурированного меченого белкового лекарственного средства;

разведения образца денатурированного меченого белкового лекарственного

средства и подвергания его анализу МСЕ на системе капиллярного электрофореза на микрочипах с получением электрофореграммы; и

определения пиков на электрофореграмме, соответствующих загрязняющим веществам или примесям.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что образец забуференного белкового лекарственного средства нагревают при 60 °С в течение 10 мин.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что образец нагревают при 35 °С в течение 15 минут.

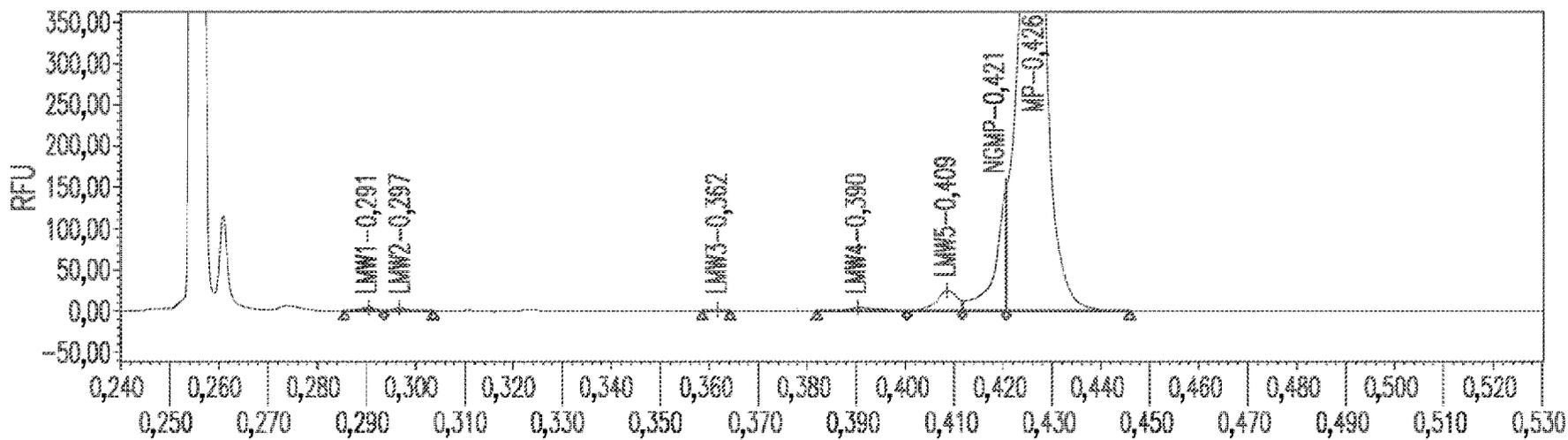
22. Способ по п. 19, отличающийся тем, что разведенный образец белкового лекарственного средства составляет 3,6 мкг/мл.

23. Способ по п. 19, отличающийся тем, что детектируемая метка представляет собой N-гидроксисукцинимидиловый эфир DY-631.

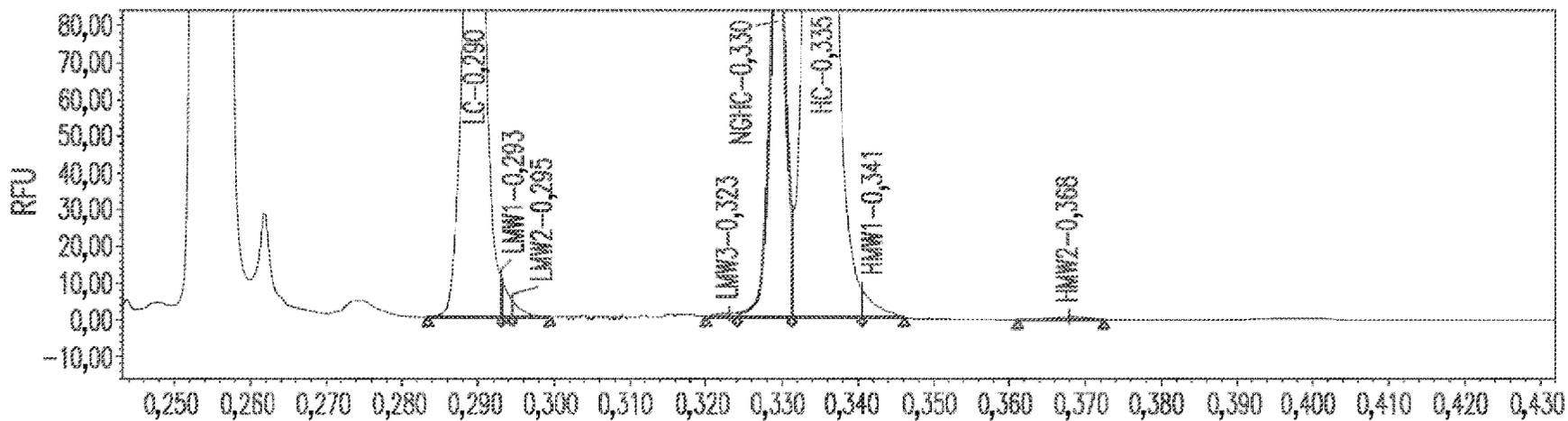
24. Способ по п. 22, отличающийся тем, что детектируемую метку восстанавливают диметилсульфоксидом (ДМСО) с последующим разведением 200 мМ буфера на основе фосфата натрия, рН 7,2.

25. Набор, содержащий буфер по п. 1, и письменные инструкции по получению образца для электрофореза в буфере.

По достоверности



Фиг. 1А



Фиг. 1В