

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490361** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.07.30

(51) Int. Cl. **G01N 33/58** (2006.01)
C07K 1/26 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.01.20

(54) **СПОСОБЫ ДЕГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА
ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ**

(31) **62/963,646**

(32) **2020.01.21**

(33) **US**

(62) **202292170; 2021.01.20**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Чжао Имин, Чен Хантер, Ван Шао-
Чунь, Рилман Тимоти, Каро Габриэль,
Ван Ин (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам анализа посттрансляционно модифицированного белка, представляющего интерес, с применением электрофореза, при этом способы включают дегликозилирование белка, представляющего интерес, после мечения.

A1

202490361

202490361

A1

СПОСОБЫ ДЕГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ЭЛЕКТРОФЕРЕЗА ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ БЕЛКОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/963646, поданной 21 января 2020 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[2] Настоящее изобретение относится к областям биохимии, молекулярной биологии и анализа белков с помощью электрофореза.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[3] Содержимое текстового файла, представленного в электронном виде, полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Копия перечня последовательностей в машиночитаемом формате (имя файла: REGE-019-001WO_SeqList_ST25.txt, дата записи: 22 декабря 2020 г., размер файла 1 килобайт).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Капиллярный электрофорез (СЕ) и капиллярный электрофорез на основе микрочипов (МСЕ) являются распространенными аналитическими способами в фармацевтической промышленности, применяемыми для определения характеристик целостности и чистоты терапевтического белка на основе размера белка и обеспечения контроля качества. В то время как стандартные, рекомендованные в промышленности способы получения образцов хорошо работают в отношении многих белков, сильно гликозилированные белки вызывают проблемы ввиду плохого разделения и количественного определения с помощью СЕ и МСЕ. Кроме того, пики частично гликозилированных и негликозилированных соединений в профиле МСЕ могут перекрываться с пиками примесей и препятствовать количественному определению. Таким образом, в данной области техники существует потребность в дополнительных способах получения образцов, которые могут решить проблемы работы с гликозилированными белками. В настоящем изобретении представлены способы мечения сильно гликозилированных белков, которые можно применять для получения белков для анализа с помощью способов электрофореза, например СЕ и МСЕ.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[5] В данном описании представлены способы анализа образца, содержащего белок, представляющий интерес, причем способы включают денатурацию, флуоресцентное мечение, гашение и дегликозилирование образца; где стадии денатурации, мечения и гашения выполняют до дегликозилирования. Способы анализа образца по настоящему изобретению могут обеспечивать уменьшение или устранение пиков электрофореграммы, обусловленных эндогликозидазой, и могут обеспечивать уменьшение интерференции со свободным красителем с обеспечением таким образом

быстрых, точных, высоковоспроизводимых и высокопроизводительных способов, с помощью которых можно анализировать гликопротеины.

[6] В описании предложены способы анализа образца, содержащего интересующий белок, при этом способы включают: (a) денатурирование образца; (b) мечение образца флуоресцентной меткой с получением меченого образца; (c) гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки в меченом образце; (d) дегликозилирование меченого образца с помощью эндогликозидазы; и (e) проведение электрофореза меченого образца, где образец подвергают денатурации, мечению и гашению на стадиях (a)-(c) перед дегликозилированием на стадии (d).

[7] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению белок, представляющий интерес, содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой гликозилированный белок. В некоторых вариантах осуществления гликозилированный белок содержит по меньшей мере один присоединенный гликан. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5% или по меньшей мере 10% от общего веса гликозилированного белка составляют гликаны (10% вес/вес).

[8] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению белок, представляющий интерес, содержит антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, предусматривает антитело, фрагмент антитела или scFv. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, предусматривает Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, предусматривает слитый белок, содержащий рецептор. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий рецептор, представляет собой слитый белок, содержащий рецептор и Fc, или растворимый слитый белок, содержащий TCR и Fc. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий рецептор, представляет собой белок-ловушку или белок-мини-ловушку. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой белок-ловушку или белок-мини-ловушку. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой рекомбинантный белок человека.

[9] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность Asn-X-Ser/Thr. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один присоединенный гликан является N-связанным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один присоединенный гликан является N-связанным с аспарагином в гликозилированном белке. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза катализирует дегликозилирование N-связанных гликанов. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза выбрана из группы, состоящей из пептид-N-гликозидазы F (PNGаза F), эндогликозидазы H (Endo H), эндогликозидазы S (Endo S), эндогликозидазы D,

эндогликозидазы F1, эндогликозидазы F2 и эндогликозидазы F4. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой PNGазу F. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F представляет собой PNGазу F Rapid. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F Rapid является невосстанавливающей. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F является восстанавливающей.

[10] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению дегликозилирование образца предусматривает нагревание образца до приблизительно 35°C в течение 30 минут. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование образца предусматривает нагревание образца до приблизительно 50°C в течение от 10 до 30 минут. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование образца предусматривает нагревание образца до приблизительно 50°C в течение 10 минут. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование образца предусматривает реакцию смесь, содержащую 0,2-1,5 мг меченого белка, представляющего интерес, и 1-5 мкл PNGазы F Rapid в реакционном объеме 10 мкл, исключая объем PNGазы F Rapid. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит 0,2 мг меченого белка, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит 5 мкл PNGазы F Rapid. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит буфер.

[11] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению по меньшей мере один гликан представляет собой O-связанный гликан. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза катализирует дегликозилирование O-связанных гликанов. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза предусматривает эндо- α -N-ацетилгалактозаминидазу (O-гликозидазу).

[12] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению мечение образца флуоресцентной меткой предусматривает нагревание образца до приблизительно 35°C в течение 10-30 минут. В некоторых вариантах осуществления мечение образца флуоресцентной меткой предусматривает нагревание образца до приблизительно 35°C в течение 15 минут.

[13] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению образец денатурируют с применением восстанавливающего раствора. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий раствор содержит дитиотреитол (DTT). В некоторых вариантах осуществления образец денатурируют с применением невосстанавливающего раствора. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор содержит йодацетамид (IAM). В некоторых вариантах осуществления денатурация образца предусматривает нагревание образца до температуры от 40°C до 99°C в течение от 1 минуты до 5 часов. В некоторых вариантах осуществления денатурация образца предусматривает нагревание образца до температуры от 50°C до 99°C в течение от 1 до 60 минут.

[14] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки предусматривает добавление стоп-

раствора.

[15] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способы дополнительно включают анализ эталонного стандарта параллельно с образцом.

[16] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению электрофорез выбран из группы, состоящей из гель-электрофореза, изоэлектрического фокусирования, капиллярного электрофореза (CE) или капиллярного электрофореза на микрочипе (MCE). В некоторых вариантах осуществления электрофорез представляет собой MCE. В некоторых вариантах осуществления MCE проводят с применением прибора для MCE.

[17] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способы обеспечивают уменьшение интерференции со свободным красителем в диапазоне менее 20 кДа и уменьшение или устранение пика эндогликозидазы на электрофореграмме по сравнению с электрофореграммой, полученной при использовании образца, меченного после дегликозилирования. В некоторых вариантах осуществления пик эндогликозидазы уменьшается на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% по сравнению с электрофореграммой, полученной при использовании образца, меченного после дегликозилирования. В некоторых вариантах осуществления пик эндогликозидазы отсутствует на электрофореграмме по сравнению с электрофореграммой, полученной при использовании образца, меченного после дегликозилирования.

[18] В настоящем изобретении предложены способы определения стабильности белка, представляющего интерес, включающие следующее: (a) оказание стрессового воздействия на образец, содержащий белок, представляющий интерес; (b) денатурирование подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца, содержащих белок, представляющий интерес; (c) мечение подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца флуоресцентной меткой с получением меченого подвергнутого стрессовому воздействию образца и меченого не подвергнутого стрессовому воздействию образца; (d) гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки в меченом подвергнутом стрессовому воздействию образце и меченом не подвергнутом стрессовому воздействию образце; (e) дегликозилирование меченого подвергнутого стрессовому воздействию образца и меченого не подвергнутого стрессовому воздействию образца с помощью эндогликозидазы; (f) проведение капиллярного электрофореза на микрочипе (MCE) для подвергнутого стрессовому воздействию меченого образца и не подвергнутого стрессовому воздействию меченого образца с получением электрофореграмм для подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца; и (g) сравнение электрофореграмм подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца, с определением таким образом стабильности белка,

представляющего интерес; при этом подвергнутый стрессовому воздействию образец и не подвергнутый стрессовому воздействию образец подвергают денатурации, мечению и гашению на стадиях (b) - (d) перед дегликозилированием на стадии (e).

[19] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению стрессовое воздействие на образец предусматривает термическое стрессовое воздействие на образец. В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие на образец предусматривает выдерживание образца при температуре от приблизительно 30°C до приблизительно 45°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 5 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 7 недель или по меньшей мере 8 недель.

[20] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению стрессовое воздействие на образец предусматривает по меньшей мере один цикл замораживания/оттаивания.

[21] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению стрессовое воздействие на образец предусматривает помещение образца в условия хранения. В некоторых вариантах осуществления условия хранения предусматривают температуру от приблизительно -80°C до -30°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяцев или по меньшей мере 30 месяцев. В некоторых вариантах осуществления условия хранения предусматривают температуру от приблизительно 2°C до 8°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев или по меньшей мере 18 месяцев.

[22] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению стрессовое воздействие на образец предусматривает механическое перемешивание образца.

[23] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению стрессовое воздействие на образец предусматривает лиофилизирование и регидратирование образца.

[24] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению стрессовое воздействие на образец предусматривает воздействие на образец света, излучения, молекул синглетного кислорода, свободных радикалов, условий с высоким pH или условий с низким pH.

[25] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению белок, представляющий интерес, содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой гликозилированный белок. В некоторых вариантах осуществления

гликозилированный белок содержит по меньшей мере один присоединенный гликан. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5% или по меньшей мере 10% от общего веса гликозилированного белка составляют гликаны (10% вес/вес). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10% от общего веса гликозилированного белка составляют гликаны (10% вес/вес).

[26] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению белок, представляющий интерес, содержит антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, предусматривает антитело, фрагмент антитела или scFv. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, предусматривает Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, предусматривает слитый белок, содержащий рецептор. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий рецептор, представляет собой слитый белок, содержащий рецептор и Fc, или растворимый слитый белок, содержащий TCR и Fc. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий рецептор, представляет собой белок-ловушку или белок-мини-ловушку. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой белок-ловушку или белок-мини-ловушку. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой рекомбинантный белок человека.

[27] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность Asn-X-Ser/Thr. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один присоединенный гликан является N-связанным. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один присоединенный гликан является N-связанным с аспарагином в гликозилированном белке. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза катализирует дегликозилирование N-связанных гликанов. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза выбрана из группы, состоящей из пептид-N-гликозидазы F (PNGаза F), эндогликозидазы H (Endo H), эндогликозидазы S (Endo S), эндогликозидазы D, эндогликозидазы F1, эндогликозидазы F2 и эндогликозидазы F4. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой PNGазу F. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F представляет собой PNGазу F Rapid. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F Rapid является невосстанавливающей. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F Rapid является восстанавливающей.

[28] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению дегликозилирование подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает нагревание образцов до приблизительно 35°C в течение 30 минут. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает нагревание образцов до приблизительно 50°C в течение от 10 до 30 минут. В некоторых вариантах

осуществления дегликозилирование подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает нагревание образцов до приблизительно 50°C в течение 10 минут. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает реакционную смесь для каждого образца, содержащую 0,2-1,5 мг меченого белка, представляющего интерес, и 1-5 мкл PNGазы F Rapid в реакционном объеме 10 мкл, исключая объем PNGазы F Rapid. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь для каждого из подвергнутого и не подвергнутого стрессовому воздействию образцов содержит 5 мкл PNGазы F Rapid. В некоторых вариантах осуществления каждый из подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов содержит 0,2 мг меченого белка, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь каждого из подвергнутого и не подвергнутого стрессовому воздействию образцов содержит буфер.

[29] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению по меньшей мере один гликан представляет собой O-связанный гликан. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза катализирует дегликозилирование O-связанных гликанов. В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза предусматривает эндо- α -N-ацетилгалактозаминидазу (O-гликозидазу).

[30] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению мечение подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов флуоресцентной меткой предусматривает нагревание каждого образца до приблизительно 35°C в течение 30 минут.

[31] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению подвергнутые и не подвергнутые стрессовому воздействию образцы подвергают денатурации с применением восстанавливающего раствора. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий раствор содержит дитиотреитол (DTT). В некоторых вариантах осуществления подвергнутые и не подвергнутые стрессовому воздействию образцы подвергают денатурации с применением невосстанавливающего раствора. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор содержит йодацетамид (IAM). В некоторых вариантах осуществления денатурирование подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает нагревание образцов до температуры от 40°C до 99°C в течение от 1 минуты до 5 часов. В некоторых вариантах осуществления денатурирование подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает нагревание образцов до температуры от 50°C до 99°C в течение от 1 до 60 минут.

[32] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки предусматривает добавление стоп-раствора.

[33] В некоторых вариантах осуществления способов по настоящему изобретению способы дополнительно включают анализ эталонного стандарта параллельно с

подвергнутыми и не подвергнутыми стрессовому воздействию образцами. В некоторых вариантах осуществления сравнение электрофореграмм подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает сравнение числа, высоты, положения, площади пиков или их комбинации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[34] На фиг. 1 представлена схема, отображающая протоколы для способа А без дегликозилирования; способа В с дегликозилированием перед мечением; и способа С с дегликозилированием после мечения. NR - невозстанавливающий, R - восстанавливающий, МС - капиллярный электрофорез на микрочипе.

[35] На фиг. 2 представлена электрофореграмма, полученная при использовании белка 1 в невозстанавливающих условиях, с применением протокола без дегликозилирования (способ А, показан красным) и протокола с дегликозилированием перед мечением белка (способ В, показан синим цветом). С помощью числовых обозначений при пиках указана молекулярная масса белков, измеренная с помощью капиллярного электрофореза на микрочипе (МСЕ). Пик PNGазы F Rapid (PNGаза) появляется на электрофореграмме в указанном месте.

[36] На фиг. 3 показаны три электрофореграммы, полученные при использовании белка 1 в невозстанавливающих условиях с применением способа В (дегликозилирование перед мечением). Образцы белка 1 не подвергали термическому стрессовому воздействию перед анализом при 37°C (0, красный, сверху), подвергали таковому в течение 2 недель (синий, посередине) или 4 недель (черный, внизу). Пик низкомолекулярного соединения 1 (LMW 1) увеличивался при стрессовом воздействии и сливался с пиком PNGазы.

[37] На фиг. 4 представлена электрофореграмма, полученная при использовании белка 1 в восстанавливающих условиях, с применением протокола без дегликозилирования (способ А, показан красным) и протокола с дегликозилированием до мечения белка (способ В, показан синим цветом). С помощью числовых обозначений при пиках указана молекулярная масса белков, измеренная с помощью МСЕ. Пик PNGазы F появляется на электрофореграмме способа В, как указано. Заштрихованная серым прямоугольная область обозначает пики свободного красителя.

[38] На фиг. 5 представлена пара электрофореграмм, полученных при использовании белка 1, где белок 1 подвергали дегликозилированию после мечения (способ С). Вверху: реакцию дегликозилирования проводили с применением 1 мкл PNGазы RapidTM при 50°C в течение 10, 15, 20 и 30 минут. Внизу: реакцию дегликозилирования проводили с применением 2 мкл PNGазы RapidTM при 50°C в течение 10, 15, 20 и 30 минут.

[39] На фиг. 6 представлена электрофореграмма, полученная при использовании способа С и белка 1, на которой показаны результаты дегликозилирования с помощью 1, 2, 3 или 4 мкл PNGазы F RapidTM в реакции, проводимой при 50°C в течение 10 минут. На вставке показан пик не полностью дегликозилированного белка 1 (правое плечо главного пика), где стрелка указывает на уменьшение количества гликозилированного белка при

увеличении количества PNGазы F RapidTM. Пики свободного красителя обозначены заштрихованной серым прямоугольной областью. MP - главный пик; LMW 1 - пик низкомолекулярного соединения 1.

[40] На фиг. 7 представлена серия из четырех электрофореграмм, полученных при использовании способа С (дегликозилирование после мечения) и белка 1, который был дегликозилирован с помощью 1, 2, 3 или 4 мкл PNGазы RapidTM (сверху вниз). Указаны пики низкомолекулярных соединений (LMW) 1-5, главный пик (MP) и пик высокомолекулярного соединения (HMW).

[41] На фиг. 8 представлена электрофореграмма, полученная посредством способа С (дегликозилирование после мечения) при использовании белка 1, подвергнутого термическому стрессовому воздействию путем выдерживания белка при 37°C в течение 4 недель (37°C, 4 недели, черный), и белка 1, не подвергнутого стрессовому воздействию (t=0, красный). Дегликозилирование проводили с применением PNGазы F RapidTM.

[42] На фиг. 9 представлена электрофореграмма, полученная при использовании белка 2, на которой представлено сравнение белка 2, меченого с дегликозилированием (способ С) и без дегликозилирования (способ А) в невосстанавливающих условиях. PNGаза F имеет ожидаемый размер 37 кДа, и этот пик отсутствует. Пики свободного красителя обозначены заштрихованной прямоугольной областью.

[43] На фиг. 10 представлена электрофореграмма, полученная при использовании белка 3, на которой представлено сравнение белка 3 с обработкой путем дегликозилирования после мечения (синий, способ С) и без обработки путем дегликозилирования (красный, способ А) в невосстанавливающих условиях. С помощью числовых обозначений при пиках указана молекулярная масса белков и фрагментов белка, измеренная с помощью МСЕ.

[44] На фиг. 11 представлена электрофореграмма, на которой представлено сравнение белка 3 с обработкой путем дегликозилирования после мечения (синий, способ С) и без обработки путем дегликозилирования (красный, способ А) в восстанавливающих условиях. С помощью числовых обозначений при пиках указана молекулярная масса белков и фрагментов белка, измеренная с помощью МСЕ.

[45] На фиг. 12 представлена электрофореграмма, на которой представлено сравнение белка 4 без дегликозилирования (способ А, красный) и белка 4, дегликозилированного после мечения (способ С, синий). Белок 4 денатурировали с использованием невосстанавливающих (NR) условий. С помощью числовых обозначений при пиках указана молекулярная масса, измеренная с помощью МСЕ. LMW - низкомолекулярные соединения; DGMP - главный пик дегликозилированного соединения; GMP - главный пик гликозилированного соединения. Пики свободного красителя обозначены заштрихованной прямоугольной областью.

[46] На фиг. 13 представлена электрофореграмма, на которой представлено сравнение белка 4, меченого без дегликозилирования (способ А, красный), и белка 4, дегликозилированного после мечения (способ С, синий). Белок 4 денатурировали с

использованием восстанавливающих (R) условий. LC - легкая цепь; DHC - дегликозилированная тяжелая цепь; GHC - гликозилированная тяжелая цепь. Пики свободного красителя обозначены заштрихованной прямоугольной областью.

[47] На фиг. 14 показаны три электрофореграммы, демонстрирующие влияние стрессового воздействия светом на стабильность белка, которые были получены в невосстанавливающих условиях при использовании способа С и белка 1. Белок 1 подвергли стрессовому воздействию светом с использованием холодного белого (CW) света флуоресцентной лампы с суммарной экспозицией 1,2 миллиона люкс в час (MLH) (синий, средний) и суммарной экспозицией 2,4 MLH (черный, внизу) и сравнивали с не подвергнутым стрессу белком 1 (красный, сверху). Дегликозилирование проводили с применением PNGазы F Rapid™. LMW - низкомолекулярные соединения; MP - главный пик; HMW - высокомолекулярные соединения.

[48] На фиг. 15 показаны три электрофореграммы, демонстрирующие влияние стрессового воздействия светом на стабильность белка, которые были получены в невосстанавливающих условиях при использовании способа С и белка 1. Белок 1 подвергали стрессовому воздействию светом при воздействии суммарной энергии света в ближнем ультрафиолетовом спектре (UVA), составляющей 200 ватт-часов/квадратный метр (синий, средний) и 400 ватт-часов/квадратный метр (черный, нижний) и сравнивали с не подвергнутым стрессу белком 1 (красный, сверху). Дегликозилирование проводили с применением PNGазы F Rapid™. LMW - низкомолекулярные соединения; MP - главный пик; HMW - высокомолекулярные соединения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[49] В настоящем изобретении представлены новые способы получения образца, содержащего белок, представляющий интерес, для анализа с помощью электрофореза. В способах, представленных в данном документе, белок, представляющий интерес, подвергают денатурации с последующим ковалентным мечением белка с применением флуоресцентного красителя и последующим гашением реакции мечения. После мечения меченый белок приводят в контакт с ферментом, таким как эндогликозидаза, для удаления гликанов из белка, представляющего интерес, без дополнительной очистки. В отличие от предыдущих способов получения гликозилированных белков для электрофореза, в которых дегликозилирование белков осуществляют перед мечением, описанные в данном документе способы обеспечивают четкое разделение молекул белков и пептидов на основании массы. Эти способы также обеспечивают устранение интерференции с ферментом, используемым в дегликозилировании, и свободным красителем из реакции мечения на электрофореграммах электрофореза на микрочипе (MCE). Эти способы являются быстрыми, высокопроизводительными и высокопроизводительными и успешно применяются для анализа гликозилированных белков. Без ограничения какой-либо теорией считается, что способы, описанные в данном документе, являются преимущественными в отношении сильно гликозилированных белков, поскольку сильное гликозилирование препятствует миграции белка в платформах для анализа методом MCE

или капиллярного электрофореза (СЕ), что приводит к получению неправильных результатов измерения молекулярной массы белка и неточных пиков на электрофореграмме. Описанные в данном документе способы можно применять в подходе с использованием платформы, применимом к любым гликозилированным белкам, анализируемым с помощью таких методов, как СЕ и МСЕ, и для определения характеристик белков или в целях контроля качества. Например, способы, описанные в данном документе, можно применять для измерения стабильности белка, представляющего интерес, при воздействии различных условий, таких как длительное время выдерживания при различных температурах или различных составах.

[50] Соответственно, в настоящем изобретении представлены способы получения образца, содержащего белок, представляющий интерес, для анализа с помощью электрофореза, включающие: (а) денатурирование образца; (b) мечение образца флуоресцентной меткой с получением меченого образца; (с) тушение непрореагировавшей флуоресцентной метки в меченом образце; (d) дегликозилирование меченого образца с помощью эндогликозидазы; и (е) проведение электрофореза меченого образца, при этом образец подвергают мечению и гашению на стадиях (b) и (с) перед дегликозилированием на стадии (d). В некоторых вариантах осуществления электрофорез представляет собой капиллярный электрофорез на микрочипе (МСЕ), и на выходе получают электрофореграмму.

Определения

[51] Использование терминов в единственном числе и подобных определений в контексте описания настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должны толковаться как охватывающие и единственное число, и множественное число, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту.

[52] Предусматривается, что приведение диапазонов значений в данном документе служит исключительно в качестве способа сокращения индивидуального указания каждого отдельного значения, входящего в данный диапазон, если в данном документе не указано иное, и при этом каждое отдельное значение включено в данное описание, как если бы оно было индивидуально упомянуто в данном документе.

[53] Использование термина «приблизительно» предназначено для описания значений либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно +/-10%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно +/-5%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно +/-2%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне примерно +/-1%. Предполагается, что вышеуказанные диапазоны будут понятны из контекста, и каких-либо дополнительных ограничений не предполагается.

[54] Используемый в данном документе термин «белок» относится к молекуле,

содержащей два или больше аминокислотных остатка, связанных друг с другом посредством пептидной связи. Белки включают полипептиды и пептиды и могут также включать продукты модификаций, таких как гликозилирование, липидное присоединение, сульфатирование, гамма-карбоксихлирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксиглирование и АДФ-рибозиглирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, и белки включают, помимо прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных способов культивирования клеток и как правило вводятся в клетку с помощью методик генной инженерии (например, с помощью последовательности, кодирующей химерный белок, или кодон-оптимизированной последовательности, последовательности без интронов и т. д.), причем в клетке генетический материал может находиться в виде эписомы или может быть интегрирован в геном клетки.

[55] Все описанные в данном документе способы можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Использование любых видов примеров или иллюстративных фраз (например, «такой как»), представленных в данном документе, предназначено исключительно для того, чтобы лучше проиллюстрировать настоящее изобретение, а не для формулирования ограничения объема настоящего изобретения, если не заявлено иное. Никакая фраза в данном описании не должна толковаться как указание, что какой-либо не заявленный элемент является существенным для осуществления настоящего изобретения на практике.

[56] Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в данном описании, включены в данное описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были конкретно и отдельно указаны для включения посредством ссылки.

Денатурирование

[57] В настоящем изобретении представлены способы денатурирования белка, представляющего интерес, в образце. Денатурирование белков предусматривает разрушение вторичных и третичных белковых структур в условиях, недостаточных для разрушения пептидных связей, при этом первичная структура остается нетронутой.

[58] Способы денатурирования белка, представляющего интерес, как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях входят в объем настоящего изобретения.

[59] Средство, восстанавливающее белок, представляет собой средство, которое разрушает дисульфидные связи. Эти дисульфидные связи могут быть внутри одного полипептида или между несколькими субъединицами белка, кодируемого на отдельном полипептиде. Разрушение дисульфидных связей между субъединицами обеспечивает возможность анализировать отдельные субъединицы мультисубъединичного белка по

отдельности. Восстанавливающие средства известны специалистам средней квалификации в данной области техники. Примеры восстанавливающих средств включают без ограничения дитиотреитол (DTT, CAS 3483-12-3), бета-меркаптоэтанол (BME, 2BME, 2-ME, b-mer, CAS 60-24-2), 2-аминоэтантол (2-MEA-HCl, также называемый цистеамин-HCl, CAS 156-57-0), гидрохлорид Tris-(2-карбоксиитил)фосфина (TCPEP, CAS 5961-85-3), гидрохлорид цистеина (Cys-HCl, CAS 52-89-1) или натриевая соль 2-меркаптоэтансульфоновой кислоты (MESNA). В данной области техники известны другие способы восстановления белковых связей, такие как колонка с иммобилизованным восстановителем, которая содержит смолу, на которой иммобилизовано восстанавливающее средство на основе тиола, для возможности твердофазного восстановления пептидных и белковых дисульфидных связей. Также предусмотрены восстанавливающие средства, в том числе окисляющие средства, пригодные для уменьшения химического взаимодействия между полипептидами.

[60] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, денатурируют с применением восстанавливающего раствора. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий раствор содержит от 135 до 155 мМ дитиотреитола (DTT). В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий раствор дополнительно содержит фосфат натрия и додецилсульфат лития. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий раствор содержит 0,69% додецилсульфата лития (LDS), 69 мМ фосфата натрия и 142 мМ дитиотреитола или по сути состоит из них. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий раствор содержит 40-120 мМ DTT, 40-80 мМ фосфата натрия и от 0,5% до 2,0% LDS. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий раствор содержит 60-100 мМ DTT, 50-70 мМ фосфата натрия и от 0,75% до 1,5% LDS. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий раствор содержит приблизительно 80 мМ DTT, приблизительно 60 мМ фосфата натрия и приблизительно 1,2% LDS. В некоторых вариантах осуществления восстанавливающий раствор добавляют к образцу, содержащему белок, представляющий интерес, в соотношении приблизительно 1:4 по объему.

[61] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, денатурируют с применением невосстанавливающего раствора, то есть в условиях, при которых в белке, представляющем интерес, сохраняются дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор содержит йодацетамид (IAM). В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор содержит от 100 до 200 мМ йодацетамида. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор дополнительно содержит фосфат натрия и додецилсульфат лития (LDS). В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор содержит 166 мМ йодацетамида (IAM). В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор содержит или по сути состоит из 166 мМ йодацетамида, 0,81% додецилсульфата лития и 81 мМ фосфата натрия. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор содержит 100-300 мМ йодацетамида, 40-80

мМ фосфата натрия и от 0,5% до 2,0% LDS. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор содержит 150-250 мМ йодацетамида, 50-70 мМ фосфата натрия и от 0,75% до 1,5% LDS. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор содержит приблизительно 200 мМ йодацетамида, приблизительно 60 мМ фосфата натрия и приблизительно 1,2% LDS. В некоторых вариантах осуществления невосстанавливающий раствор добавляют к образцу, содержащему белок, представляющий интерес, в соотношении приблизительно 1:4 по объему.

[62] В некоторых вариантах осуществления денатурирование образца предусматривает добавление к образцу восстанавливающего или невосстанавливающего раствора и нагревание объединенного образца и восстанавливающего или невосстанавливающего раствора. В некоторых вариантах осуществления образец денатурируют посредством нагревания. Например, объединенный образец и восстанавливающий или невосстанавливающий раствор можно нагревать до температуры от 30°C до 99°C, от 30°C до 90°C, от 30°C до 80°C, от 30°C до 70°C, от 30°C до 60°C, от 30°C до 50°C, от 30°C до 40°C, от 40°C до 99°C, от 40°C до 90°C, от 40°C до 80°C, от 40°C до 70°C, от 40°C до 60°C, от 40°C до 50°C, от 50°C до 99°C, от 50°C до 90°C, от 50°C до 80°C, от 50°C до 70°C или от 50°C до 60°C. В некоторых вариантах осуществления объединенный образец и восстанавливающий или невосстанавливающий раствор можно нагревать в течение от 1 минуты до 12 часов, от 1 минуты до 10 часов, от 1 минуты до 5 часов, от 1 минуты до 4 часов, от 1 минуты до 3 часов, от 1 минуты до 2 часов, от 1 минуты до 60 минут, от 1 минуты до 30 минут, от 1 минуты до 15 минут, от 1 минуты до 10 минут, от 1 минуты до 5 минут, от 5 минут до 60 минут, от 5 минут до 30 минут, от 5 минут до 15 минут, от 5 минут до 10 минут, от 10 минут до 60 минут, от 10 до 45 минут, от 10 минут до 30 минут или от 10 минут до 15 минут. В некоторых вариантах осуществления объединенный образец и восстанавливающий или невосстанавливающий раствор можно нагревать до температуры от 40°C до 99°C в течение от 1 минуты до 60 минут. В некоторых вариантах осуществления объединенный образец и восстанавливающий или невосстанавливающий раствор можно нагревать до температуры от 50°C до 99°C в течение от 1 минуты до 60 минут. В качестве еще одного примера, объединенный образец и восстанавливающий или невосстанавливающий раствор можно нагревать до температуры от 60°C до 85°C в течение от 5 до 30 минут. В качестве альтернативы объединенный образец и восстанавливающий или невосстанавливающий раствор можно нагревать до 75°C в течение 10 минут. В некоторых вариантах осуществления объединенный образец и восстанавливающий или невосстанавливающий раствор нагревают до 70°C в течение 10 минут.

Дегликозилирование

[63] В настоящем изобретении представлены способы дегликозилирования белка, представляющего интерес, в образце. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, подвергают дегликозилированию после мечения

флуоресцентной меткой с применением способов, описанных в данном документе. Дегликозилирование можно выполнять с применением фермента, например эндогликозидазы.

[64] Гликопротеины представляют собой белки, содержащие олигосахаридные цепи (гликаны), ковалентно присоединенные к боковым цепям аминокислот. Эти олигосахаридные цепи присоединены к белку в котрансляционной или посттрансляционной модификации.

[65] Используемый в данном документе термин «гликан», иногда используемый взаимозаменяемо с терминами «полисахарид» и «олигосахарид», относится к соединению, содержащему связанные посредством гликозидной связи моносахариды, или состоящему из них. Термин гликан также можно использовать для обозначения углеводорода, связанного с гликопротеином или гликолипидом, даже если углеводород представляет собой моносахарид. Гликаны могут предусматривать O-гликозидные связи моносахаридов. Гликаны могут представлять собой гомо- или гетерополимеры моносахаридов и могут быть линейными или разветвленными. Примеры гликанов могут включать среди прочего мономеры маннозы, N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), N-гликолилнейраминовой кислоты (Neu5Gc), галактозы, сиаловой кислоты и фукозы.

[66] Гликаны могут быть связаны с белком, представляющим интерес, посредством либо N-связей, либо O-связей, и белок, представляющий интерес, может содержать N-связанные гликаны, O-связанные гликаны или комбинацию N-связанных и O-связанных гликанов. Как упоминается в данном документе, «N-связанные гликаны» или «N-связанное гликозилирование» относятся к присоединению мономера сахара или полисахарида к атому азота, такому как азот амидной группы аминокислоты, представляющей собой аспарагин (Asn), белка. Используемые в данном документе термины «O-связанные гликаны» или «O-связанное гликозилирование» относятся к присоединению мономера сахара или полисахарида к атому кислорода аминокислоты, представляющей собой серин (Ser) или треонин (Thr), белка. Примеры O-связанных гликанов включают без ограничения O-N-ацетилгалактозамин (O-GalNAc), O-N-ацетилглюкозамин (O-GlcNAc), O-маннозу, O-галактозу, O-фукозу и O-глюкозу.

[67] Эндогликозидазы представляют собой ферменты, гидролизующие внутренние гликозидные связи в олигосахаридах. Если олигосахариды являются частью гликопротеина, это обеспечивает высвобождение олигосахаридов из гликопротеина.

[68] Используемый в данном документе термин «эндогликозидаза» относится к ферменту, который обеспечивает высвобождение гликанов из гликопротеинов или гликолипидов. Эндогликозидазы могут расщеплять полисахаридные замены между остатками, которые не являются концевыми остатками, и, таким образом, способны высвобождать углеводы с длинной цепью из их когнатных белковых конъюгатов. Примеры эндогликозидаз включают без ограничения пептид-N-гликозидазу F (PNGазу F), эндогликозидазу H (Endo H), эндогликозидазу S (Endo S), эндогликозидазу D, эндогликозидазу F1, эндогликозидазу F2, эндогликозидазу F3, O-гликозидазу и эндо-β-

галактозидазу.

[69] В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза катализирует дегликозилирование N-связанных гликанов. Примеры эндогликозидаз, нацеленных на N-связанные гликаны, включают без ограничения пептид-N-гликозидазу F (PNGазу F), эндогликозидазу H (Endo H), эндогликозидазу S (Endo S), эндогликозидазу D, эндогликозидазу F1, эндогликозидазу F2 и эндогликозидазу F4. В некоторых вариантах осуществления, например в тех вариантах осуществления, в которых белок, представляющий интерес, содержит N-связанные гликаны, эндогликозидаза представляет собой PNGазу F.

[70] В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза катализирует дегликозилирование O-связанных гликанов. Примеры эндогликозидаз, нацеленных на O-связанные гликаны, включают без ограничения эндо- α -N-ацетилгалактозаминидазу (O-гликозидазу).

[71] В некоторых вариантах осуществления эндогликозидаза представляет собой PNGазу F. PNGаза F представляет собой амидазу, которая расщепляет наиболее удаленные от края остатки N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc) и аспарагина высокоманнозных, гибридных и сложных олигосахаридов в N-связанных гликопротеинах. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F является рекомбинантной. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F представляет собой PNGазу F RapidTM. PNGаза F RapidTM известна в данной области техники и доступна от New England Biolabs и других поставщиков. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F RapidTM представлена в невосстанавливающем формате, который сохраняет дисульфидные связи в белке, представляющем интерес. В некоторых вариантах осуществления PNGаза F RapidTM представлена в восстанавливающем формате, который не сохраняет дисульфидные связи в белке, представляющем интерес.

[72] В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование образца предусматривает реакционную смесь, содержащую от 0,1 до 3,0 мг меченого белка, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит от 0,1 до 2,0 мг меченого белка, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит от 0,1 до 1,5 мг белка, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит от 0,5 до 1,5 мг белка, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит 0,2 мг меченого белка, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит от 1 до 7 мкл фермента PNGаза F RapidTM в реакционном объеме 10 мкл, исключая объем фермента. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит от 1 до 5 мкл фермента PNGаза F RapidTM в реакционном объеме 10 мкл, исключая объем фермента. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит 1 мкл, 2 мкл, 3 мкл, 4 мкл, 5 мкл, 6 мкл или 7 мкл фермента PNGаза F RapidTM, добавленного к объему 10 мкл, содержащему меченый белок, представляющий интерес. В некоторых

вариантах осуществления реакционная смесь содержит 5 мкл фермента PNGаза F Rapid™ в реакционном объеме 10 мкл, исключая объем фермента. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит 5 мкл фермента PNGаза F Rapid™, добавленного к объему 10 мкл, содержащему меченый белок, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь содержит дополнительный буфер, например реакционный буфер, который способствует действию фермента PNGаза F. В некоторых вариантах осуществления реакционная смесь не содержит дополнительного буфера.

[73] В некоторых вариантах осуществления, например в тех вариантах осуществления, где эндогликозидаза представляет собой PNGазу F, дегликозилирование образца предусматривает нагревание образца до температуры от 25°C до 65°C в течение от 10 до 60 минут. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование образца предусматривает нагревание образца до температуры от 30°C до 50°C в течение от 20 до 40 минут. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование образца предусматривает нагревание образца до 35°C в течение 30 минут.

[74] В некоторых вариантах осуществления, например в тех вариантах осуществления, где эндогликозидаза представляет собой PNGазу F Rapid™, дегликозилирование образца предусматривает нагревание образца до 50°C в течение от 10 до 30 минут. В некоторых вариантах осуществления дегликозилирование образца предусматривает нагревание образца до 50°C в течение 10 минут.

Мечение белка

[75] В настоящем изобретении представлены способы мечения белков, представляющих интерес. В некоторых вариантах осуществления белки, представляющие интерес, перед дегликозилированием подвергают мечению. В некоторых вариантах осуществления белки, представляющие интерес, помечены флуоресцентной меткой, такой как флуоресцентный краситель. Любая подходящая метка предусмотрена как охваченная объемом настоящего изобретения.

[76] Используемые в данном документе термины «обнаруживаемая метка» или «метка» относятся к химическому веществу, используемому для обеспечения идентификации и/или количественного определения целевого вещества, такого как белок, представляющий интерес. Иллюстративные метки включают метки, которые можно непосредственно наблюдать или измерять, или косвенно наблюдать или измерять. Такие метки включают без ограничения радиоактивные метки, которые можно измерить с помощью устройств для измерения уровня радиации; пигменты, красители или другие хромогены, которые можно наблюдать визуально или измерять с помощью спектрофотометра; хемилюминесцентные метки, которые можно измерить с помощью прибора на основе фотоумножителя или фотопленки, спиновые метки, которые можно измерить с помощью анализатора спиновых меток; и флуоресцентные фрагменты, где выходной сигнал генерируется при возбуждении подходящего молекулярного аддукта и может быть визуализирован при возбуждении светом, поглощаемым красителем, или

может быть измерен с помощью стандартных флуориметров или систем визуализации. Метка может представлять собой люминесцентное вещество, например люминофор или флуороген; биолюминесцентное вещество; хемилюминесцентное вещество, где выходной сигнал генерируется химической модификацией сигнального соединения; металлсодержащее вещество; или фермент, где происходит зависимость от фермента вторичная генерация сигнала, например образование окрашенного продукта из бесцветного субстрата или спонтанно хемилюминесцентного продукта из подходящего предшественника. Термин «метка» может также относиться к «средству для мечения» или гаптену, который может избирательно связываться с меченой молекулой, так что меченая молекула при последующем добавлении используется для генерации обнаруживаемого сигнала.

[77] Специалистам в данной области техники известны многочисленные метки, в том числе без ограничения микрочастицы, флуоресцентные красители, гаптены, ферменты и их хромогенные, флуорогенные и хемилюминесцентные субстраты, а также другие метки, описанные в *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* by Richard P. Haugland, 6th Ed., (1996), а также его последующих обновленных 7-м и 8-м изданиях, выпущенных на компакт-дисках в ноябре 1999 г. и мае 2001 г. соответственно, содержание которых включено в посредством ссылки, и в других опубликованных источниках.

[78] Примеры флуоресцентных меток включают без ограничения флуоресцентные красители. Используемый в данном документе термин «флуоресцентный краситель» относится к небелковым молекулам, которые поглощают свет и излучают его с большей длиной волны. Примеры флуоресцентных красителей включают без ограничения красители Alexa Fluor®, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), тетраметилродаминизотиоцианат (TRITC), DyLight fluors, Cy-красители, IRD-красители, HiLyte-красители, сульфированные и/или пегилированные кумариновые красители, сульфированные и/или пегилированные ксантеновые красители, сульфонируемые или/или пегилированные цианиновые красители и сульфонируемые и/или пегилированные пиреновые красители.

[79] Дополнительная обнаруживаемая метка включает без ограничения сложный эфир красителя DY-631 от Dyomics и NHS. Другие обнаруживаемые метки, которые можно использовать, включают другие красители, флуорофоры, хромофоры, маркеры массы, квантовые точки и т. п., а также те, что раскрыты в патенте США № 6924372, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[80] Примеры флуоресцентных меток также включают без ограничения биологические флуорофоры, такие как зеленый флуоресцентный белок, и наноразмерные кристаллы, такие как квантовые точки.

[81] Дополнительный пример флуоресцентной метки доступен от Perkin Elmer в качестве части набора реагентов Pico Protein Reagent Kit (также называемого Protein Pico Assay Reagent Kit, номер по каталогу 760498). В некоторых вариантах осуществления

флуоресцентная метка содержит краситель для мечения Pico от Perkin Elmer. В некоторых вариантах осуществления мечение белка, представляющего интерес, предусматривает добавление 4-20 мкМ раствора красителя Pico к образцу, содержащему белок, представляющий интерес, в соотношении приблизительно 1:1 по объему. В некоторых вариантах осуществления мечение белка, представляющего интерес, предусматривает добавление к образцу 4 мкМ, 5 мкМ, 6 мкМ, 10 мкМ, 12 мкМ, 14 мкМ, 15 мкМ, 16 мкМ, 18 мкМ, 20 мкМ или 25 мкМ раствора красителя Pico, содержащего белок, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления раствор красителя Pico добавляют к образцу, содержащему белок, представляющий интерес, в соотношении приблизительно 1:5 красителя к образцу по объему, 1:4 красителя к образцу по объему, 1:3 красителя к образцу по объему, 1:2 красителя к образцу по объему 1:1 по объему, 2:1 красителя к образцу по объему, 3:1 красителя к образцу по объему, 4:1 красителя к образцу по объему или 5:1 красителя к образцу по объему. В некоторых вариантах осуществления мечение белка, представляющего интерес, предусматривает добавление 16 мкМ раствора красителя Pico к образцу, содержащему белок, представляющий интерес, в соотношении приблизительно 1:1 по объему. В некоторых вариантах осуществления способы предусматривают нагревание образца и красителя.

[82] В некоторых вариантах осуществления флуоресцентная метка или краситель ковалентно присоединены к белку, представляющему интерес. В некоторых вариантах осуществления флуоресцентная метка содержит группу, реагирующую с амином, и ковалентно присоединена к свободным аминам в белке, представляющем интерес. В некоторых вариантах осуществления метка нековалентно присоединена к белку, представляющему интерес, посредством высокоаффинного взаимодействия.

[83] Дополнительные подходящие наборы для мечения белков известны специалистам средней квалификации в данной области техники. Типовые наборы включают без ограничения набор для мечения антител/белков-FITC от MedChemExpress и наборы для конъюгации (Fast) Alexa Fluor®.

[84] Любая ковалентно присоединенная флуоресцентная метка и любые способы присоединения флуоресцентной метки предусмотрены как охваченные объемом настоящих способов.

[85] В некоторых вариантах осуществления образец и краситель нагревают до температуры от приблизительно 30°C до 40°C в течение от приблизительно 5 до 40 минут. В некоторых вариантах осуществления образец и краситель нагревают до температуры от приблизительно 30°C до 40°C в течение приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 25 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 35 минут или приблизительно 40 минут. В некоторых вариантах осуществления образец и краситель нагревают до температуры приблизительно 35°C в течение приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 25 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 35 минут или приблизительно 40 минут. В

некоторых вариантах осуществления образец и метку нагревают до приблизительно 35°C в течение приблизительно 15 минут. На этой стадии нагревания можно получить образец, содержащий денатурированный меченый белок, представляющий интерес. Избыток метки можно удалить с образца, например, с помощью спинного фильтра.

[86] В некоторых вариантах осуществления реакцию мечения останавливают перед реакцией дегликозилирования (гашением). Например, в тех вариантах осуществления, где флуоресцентная метка представляет собой краситель для мечения Pico от Perkin Elmer, реакцию мечения можно остановить, добавив к реакционной смеси для мечения равный объем стоп-буфера Pico от Perkin Elmer. В некоторых вариантах осуществления реакцию мечения гасят путем добавления 5 мкл, 6 мкл, 7 мкл, 8 мкл, 9 мкл, 10 мкл, 11 мкл, 12 мкл, 13 мкл, 14 мкл, 15 мкл, 16 мкл, 17 мкл, 18 мкл, 19 мкл или 20 мкл соответствующего стоп-раствора к реакционной смеси для мечения. В некоторых вариантах осуществления краситель представляет собой краситель для мечения Pico от Perkin Elmer, и реакцию мечения гасят путем добавления 5 мкл стоп-раствора Pico от Perkin Elmer к реакционной смеси для мечения. Дополнительные иллюстративные стоп-буферы, например, если метка содержит аминореактивный флуоресцентный краситель, включают 1,5 М гидроксилламин, pH 8,5. Специалист средней квалификации сможет выбрать подходящий стоп-буфер для различных реакций мечения красителем. Без ограничения теории считается, что гашение реакции мечения предупреждает мечение фермента эндогликозидазы, используемого для последующих стадий дегликозилирования. Это предотвращает появление пика меченой эндогликозидазы на электрофореграмме, используемой для визуализации меченого образца, или уменьшает его.

Белок, представляющий интерес

[87] В настоящем изобретении представлены способы получения образца, содержащего белок, представляющий интерес, для анализа с применением электрофореза. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, является гликозилированным. В некоторых вариантах осуществления способы включают мечение белка, представляющего интерес, с последующим дегликозилированием.

[88] Все белки, представляющие интерес, содержащие посттрансляционные модификации, такие как N-связанное или O-связанное гликозилирование, предусмотрены как охваченные объемом настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой терапевтический белок, например терапевтическое антитело, которое может быть лекарственным веществом, составленным лекарственным веществом или лекарственным продуктом.

[89] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, содержит антигенсвязывающий домен. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой слитый белок. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, содержит антитело, фрагмент антитела или одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой антитело, фрагмент

антитела или scFv.

[90] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, предусматривает рекомбинантный белок человека. Например, белок, представляющий интерес, может предусматривать человеческое антитело или фрагмент антитела или гуманизированное антитело или фрагмент антитела.

[91] Используемый в данном документе термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, содержащей четыре полипептидные цепи, - две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит 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 содержит переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). VH- и VL-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми 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» предусматривает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» предусматривает молекулы антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии данного антитела. Термин антитело также предусматривает биспецифическое антитело, которое предусматривает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним отличающимся эпитопом. Биспецифические антитела в целом описаны в патенте США № 8586713, который включен в данную заявку посредством ссылки.

[92] Термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или «фрагмент антитела») относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) Fab-фрагмент - одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент - двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989) Nature 241:544-546), который состоит из домена VH, (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов Fv-фрагмента, VL и VH, связанных синтетическим линкером с образованием одной белковой цепи, в которой области VL и VH попарно объединены с образованием одновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, таких как диатела, также охватываются термином

«антитело» (см., например, Holliger et al. (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) Structure 2: 1121-1123).

[93] Кроме того, антитело или его антигенсвязывающая часть могут быть частью более крупной иммуноадгезивной молекулы, образованной в результате ковалентной или нековалентной ассоциации антитела или его части с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких иммуноадгезивных молекул включают применение коровой области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101) и применение остатка цистеина, маркерного пептида и С-концевого полигистидинового средства для мечения для получения двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058). Части антител, например Fab- и F(ab')₂-фрагменты, могут быть получены из цельных антител с применением общепринятых методик, таких как расщепление цельных антител папаином или пепсином. Более того, антитела, части антител и иммуноадгезивные молекулы могут быть получены с применением стандартных методик рекомбинантной ДНК, широко известных в данной области техники (см. Sambrook et al., 1989).

[94] Термин «человеческое антитело» предусматривает антитела, содержащие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые с помощью случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или с помощью соматической мутации *in vivo*), например в CDR, и в частности CDR3.

[95] Термин «гуманизированное антитело», используемый в данном документе, предусматривает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например мыши, были привиты к человеческим каркасным последовательностям или иным образом модифицированы для повышения их сходства с вариантами антител, продуцируемыми естественным образом у человека.

[96] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, является антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к белку запрограммированной гибели клетки 1 (например, антитела к PD1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела к лиганду-1 запрограммированной гибели клетки (например, антитело к PD-L1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), антитела к D114, антитела к ангиопоэтину-2 (например, антитело к ANG2, как описано в патенте США № 9402898), антитела к ангиопоэтин-подобному белку 3 (например, антитело к AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитело к PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела к Erb3, антитела к рецептору пролактина (например, антитело к PRLR, как

описано в патенте США № 9302015), антитела к компоненту 5 системы комплемента (например, антитело к C5, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0313194A1), антитела к TNF, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитело к EGFR, как описано в патенте США № 9132192, или антитело к EGFRvIII, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0259423A1), антитело к пропротеиновой конвертазе субтилизин-кексинового типа 9 (например, антитело к PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или патенте США № 9540449), антитела к фактору-8 роста и дифференцировки (например, антитело к GDF8, также известное как антитело к миостатину, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела к рецептору глюкагона (например, антитело к GCGR, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитело к IL4R, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271681A1 или патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, антитело к IL6R, как описано в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), 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, антитело к IL33, как описано в патентах США №№ 9453072 или 9637535), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, антитело к RSV, как описано в публикации заявки на патент США № 9447173), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, антитело к CD3, как описано в патентах США №№ 9447173 и 9447173 и в заявке на патент США № 62/222605), антитела к кластеру дифференцировки 20 (например, антитело к CD20, как описано в патентах США № 9657102 и US20150266966A1 и в патенте США № 7879984), антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, антитело к CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела к Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, антитело к MERS, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0337029A1), антитела к вирусу Эбола (например, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к гену активации лимфоцитов 3 (например, антитело к LAG3 или антитело к CD223), антитела к фактору роста нервной ткани (например, антитело к NGF, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0017029 и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела к белку Y. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела к CD3 и к CD20 (как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела к CD3 и к муцину-16 (например, биспецифического антитела к CD3 и к Muc16) и биспецифического антитела к CD3 и к простат-специфическому мембранному антигену (например, биспецифическое антитело к CD3 и к PSMA).

[97] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес,

выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-atto, адотрастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белимумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтанзина алирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гуселькумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-abda, инфликсимаба-duyb, 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.

[98] Белки, представляющие интерес, могут быть созданы или выделены любыми способами, известными в данной области техники. К ним относятся рекомбинантные средства, такие как белки (например, антитела), экспрессированные с применением рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина. Антитела, которые являются белками, представляющими интерес, могут быть выделены из библиотеки рекомбинантных комбинаторных антител человека, выделенных из животного (например, мыши), трансгенного по генам иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) или получены, экспрессированы, созданы или выделены любыми другими способами, которые предусматривают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека содержат переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В определенных вариантах осуществления рекомбинантные антитела человека подвергают мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям человеческого Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей VH и VL рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и родственны им, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

[99] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, содержит домен, представляющий собой кристаллизуемый фрагмент (Fc). Например, белок, представляющий интерес, может представлять собой слитый белок, содержащий рецептор и Fc, или растворимый слитый белок, содержащий TCR и Fc. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий рецептор и Fc, представляет собой белок-ловушку.

[100] Слитые белки содержат две или больше частей белка, которые иным образом

не встречаются вместе в природе. Например, «белок, являющийся продуктом слияния с Fc» может содержать Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которая слита с другим гетерологичным доменом, таким как лигандсвязывающий домен рецептора. Получение слитых белков, содержащих гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая Fc-домен), было описано, например, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., «Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins», в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, стр. 10.19.1-10.19.11, 1992. «Слитые белки, содержащие рецептор и Fc» содержат один или более внеклеточных доменов рецептора, соединенных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которой следуют CH2- и CH3-домены иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, содержащий Fc, содержит две или более различных цепей рецептора, которые связываются с одним или более лигандами. Например, слитый белок, содержащий Fc, представляет собой ловушку, такую как, например, ловушку для интерлейкина 1 (IL-1) (например, рилонцепт, который содержит лигандсвязывающую область RAcP для IL-1, слитую с внеклеточной областью R1 для IL-1, слитую с Fc hlgG1; см. патент США № 6927004), или ловушку для фактора роста эндотелия сосудов А (VEGF) (например, афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, слитого с Fc hlgG1, см. патенты США № 7087411 и 7279159).

[101] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой слитый белок, например слитый белок, содержащий рецептор. Слитые белки, содержащие рецептор, могут включать среди прочего белки-ловушки и белки-мини-ловушки.

[102] Термин «слитый белок» относится к молекуле, содержащей два или более белков или их фрагментов, связанных ковалентной связью по их индивидуальным пептидным остовам, необязательно получаемой посредством генетической экспрессии молекулы полинуклеотида, кодирующей слитый белок.

[103] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой белок-ловушку или белок-мини-ловушку. В некоторых вариантах осуществления белки-ловушки представляют собой сконструированные терапевтические белки, способные действовать в качестве рецепторов-ловушек для связывания и противодействия или модуляции активности целевого белка. Иллюстративный белок-ловушка содержит один или более компонентов рецептора, которые имитируют связывающий домен рецептора для его целевого белка (например, Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt-1 и Ig-домен 3), слитые с константной областью IgG человека, при этом он необязательно содержит дополнительные домены, такие как линкеры, домены димеризации или мультимеризации и сайты расщепления. В некоторых вариантах осуществления белок-ловушка усечен или имеет уменьшенный размер (мини-ловушка), например, за счет расщепления белка, что может способствовать проникновению мини-

ловушки в ткань. Неограничивающие примеры белков-ловушек включают ловушку для IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, которая, в свою очередь, слита с Fc hlgG1) (например, SEQ ID NO: 1) (см. патент США № 6927004) или ловушку VEGF (например, афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, который, в свою очередь, слит с Fc hlgG1. См., например, патенты США №№ 7087411, 7279159; см. также патент США № 5610279 на этанерцепт (ловушка для TNF), содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Получение белка

[104] Белок, представляющий интерес, анализируемый с помощью описанных в данном документе способов, может быть получен любым способом, известным в данной области техники. Например, белок, представляющий интерес, может быть получен с помощью культур клеток. Культуры клеток могут представлять собой «периодическую культуру клеток с подпиткой» или «периодическую культуру с подпиткой», что относится к периодической культуре, где в сосуд для культивирования изначально добавляют клетки и среду для культивирования и в ходе культивирования в культуру отдельными порциями медленно подают дополнительные питательные вещества для культивирования с периодическим сбором клеток и/или продукта до завершения культивирования или без такового. Периодическая культура с подпиткой включает «полунепрерывную периодическую культуру с подпиткой», где периодически всю культуру (которая может содержать клетки и среду) удаляют и заменяют свежей средой. Периодическая культура с подпиткой отличается от простой «периодической культуры», поскольку в периодической культуре все компоненты для культивирования клеток (включая клетки животных и все питательные вещества культуры) подаются в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования. Периодическая культура с подпиткой может отличаться от «перфузионной культуры» тем, что при стандартном периодическом процессе с подпиткой супернатант не удаляется из сосуда для культивирования, тогда как при культивировании с перфузией клетки удерживаются в культуре, например, с помощью фильтрации, и среда для культивирования непрерывно или периодически вводится в сосуд для культивирования и удаляется из него. Тем не менее, предполагается отбор образцов для целей тестирования во время периодического культивирования клеток с подпиткой. Периодический процесс с подпиткой продолжается до тех пор, пока не будет определено, что максимальный рабочий объем и/или продуцирование белка достигнуты, после чего осуществляют сбор белка.

[105] Культура клеток может представлять собой «непрерывную культуру клеток», которая представляет собой методику, используемую для непрерывного выращивания клеток, обычно в определенной фазе роста. Например, если требуется постоянный источник клеток или требуется получение конкретного белка, представляющего интерес, культура клеток может требовать поддержания на определенной фазе роста. Таким

образом, условия должны постоянно контролироваться и корректироваться соответствующим образом, чтобы поддерживать клетки в этой конкретной фазе.

[106] Клетки культивируют в среде для культивирования клеток. Термины «среда для культивирования клеток» и «среда для культивирования» относятся к питательному раствору, используемому для выращивания клеток млекопитающих, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как источник энергии в виде углеводов, незаменимые (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и заменимые (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин) аминокислоты, микроэлементы, источники энергии, липиды, витамины и т. д. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые снабжают клетки исходными материалами, поддерживающими рост клеток. Среды могут содержать дрожжевой экстракт или соевый экстракт вместо животных экстрактов. Среда с определенным химическим составом относится к среде для культивирования клеток, в которой все химические компоненты известны (т. е. имеют известную химическую структуру). Среда с определенным химическим составом не содержит компонентов животного происхождения, таких как пептоны сывороточного или животного происхождения. В одном варианте осуществления среда представляет собой среду с определенным химическим составом.

[107] «Линия клеток» относится к клетке или клеткам, которые получены из определенной линии посредством серии пересевов или субкультивирования клеток. Термин «клетки» используется взаимозаменяемо с «популяцией клеток». Термин «клетка» включает любую клетку, которая подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают таковые из прокариот и эукариот, такие как бактериальные клетки, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки животных, отличных от человека, клетки птиц, клетки насекомых, дрожжевые клетки или продукты слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квадромы. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомячка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления клетка выбрана из следующих клеток: клетка яичника китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggio-CHO), COS (например, COS-7), клетка сетчатки, Vero, CV1, клетка 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 Daudi (В-лимфоцит), A431 (эпидермальная), U937, 3T3, L-клетка, клетка C127, SP2/0, NS-0, клетка ММТ, стволовая клетка, опухолевая клетка и линия клеток, происходящих из вышеупомянутой клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более генов вируса, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует ген вируса (например, клетка PER.C6®). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах

осуществления клетка представляет собой клетку CHO K1.

[108] Клетки можно трансформировать гетерологичными полинуклеотидами, кодирующими белок, представляющий интерес, с применением любого способа, известного в данной области техники, в том числе без ограничения трансформации, трансфекции, электропорации и т. п.

[109] Термин «гетерологичный полинуклеотид» относится к полинуклеотидной последовательности, кодирующей гетерологичную нуклеотидную последовательность, не обнаруживаемую в клетке дикого типа, которая может включать последовательность, кодирующую белок, представляющий интерес. Примеры гетерологичных полинуклеотидов включают векторы, содержащие последовательность, кодирующую белок, представляющий интерес, в том числе без ограничения плазмидные, фаговые и вирусные частицы. Необязательно вектор обеспечивает перенос конкретной молекулы нуклеиновой кислоты в клетку. При введении в соответствующую клетку вектор экспрессии содержит необходимые генетические элементы для управления экспрессией белка, представляющего интерес. Примеры векторов могут содержать элементы промотора транскрипции (т. е. последовательность контроля экспрессии), которые функционально связаны с последовательностью, кодирующей белок, представляющий интерес. Вектор может состоять либо из ДНК, либо из РНК, либо из комбинации их двух (например, химера ДНК-РНК). Необязательно вектор может содержать последовательность полиаденилирования, один или более сайтов рестрикции, а также один или более селективируемых маркеров, таких как фосфотрансфераза или гигромицинофосфотрансфераза. Кроме того, в зависимости от выбранного типа клеток и используемого вектора, в вектор также могут быть включены другие генетические элементы, такие как точка начала репликации, дополнительные сайты рестрикции нуклеиновых кислот, энхансеры и последовательности, придающие транскрипции свойство индуцируемости. Выбор подходящих векторов и способов трансформации очевиден для специалистов средней квалификации в данной области техники.

Гликозилирование

[110] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, является гликозилированным. Гликозилирование может включать N-связанное гликозилирование, O-связанное гликозилирование или их комбинацию. Многие белки, представляющие интерес, и полипептиды, получаемые в культуре клеток, представляют собой гликопротеины, которые содержат ковалентно связанные углеводородные структуры, в том числе олигосахаридные цепи (гликаны). Такие олигосахаридные цепи связываются с белком в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи посредством либо N-связей, либо O-связей. Олигосахаридные цепи могут составлять значительную часть массы гликопротеина. Олигосахаридные цепи могут играть определенные роли, в том числе в обеспечении правильного сворачивания гликопротеина, опосредовании межбелковых взаимодействий, придании стабильности, придании полезных фармакодинамических и/или фармакокинетических свойств, ингибировании

протеолитического расщепления, нацеливании гликопротеина на правильный секреторный путь и нацеливании гликопротеина на определенный орган или органы.

[111] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, предусматривает N-связанное гликозилирование. Как правило, N-связанные олигосахаридные цепи добавляются к формирующемуся белку, перемещающемуся в просвете эндоплазматического ретикулума. Олигосахарид добавляется к аминогруппе на боковой цепи остатка аспарагина, содержащегося в целевой консенсусной последовательности, такой как Asn-X-Ser/Thr или, в некоторых случаях, Asn-X-Cys, где X может представлять собой любую аминокислоту, кроме пролина. Начальная олигосахаридная цепь как правило обрезается специфическими ферментами гликозидазами в эндоплазматическом ретикулуме, в результате чего образуется короткая разветвленная основа олигосахаридов, состоящая из двух остатков N-ацетилглюкозамина и трех остатков маннозы.

[112] После первоначального процессинга в эндоплазматическом ретикулуме гликопротеин может подвергаться дополнительному процессингу, прежде чем он будет секретирован на клеточную поверхность. N-связанные олигосахаридные цепи могут быть модифицированы путем добавления остатков маннозы, что приводит к получению олигосахаридов с высоким содержанием маннозы. Альтернативно, к маннозным субъединицам основы может быть добавлено одно или более моносахаридных звеньев N-ацетилглюкозамина с образованием сложных олигосахаридов. К субъединицам N-ацетилглюкозамина можно добавлять галактозу, а к субъединицам галактозы можно добавлять субъединицы сиаловой кислоты, что приводит к получению цепей, которые заканчиваются остатком сиаловой кислоты, галактозы или N-ацетилглюкозамина. Кроме того, к остатку N-ацетилглюкозамина основы олигосахаридов может быть добавлен остаток фукозы. Каждое из этих добавлений катализируется специфическими гликозилтрансферазами.

[113] В дополнение к модификации путем N-связанного гликозилирования гликопротеины также могут быть модифицированы путем добавления O-связанных олигосахаридных цепей к определенным остаткам серина или треонина по мере их процессинга в аппарате Гольджи. Остатки O-связанного олигосахаридов добавляются по одному, и добавление каждого остатка катализируют определенным ферментом. В отличие от N-связанного гликозилирования, консенсусная аминокислотная последовательность для O-связанного гликозилирования не так четко определена. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, предусматривает наличие O-связанного гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления O-связанное гликозилирование предусматривает присоединение молекулы сахара к аминокислоте, представляющей собой серин (Ser) или треонин (Thr), белка, представляющего интерес.

[114] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой гликозилированный белок. В некоторых вариантах осуществления

гликозилированный белок содержит по меньшей мере один присоединенный гликан. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, содержит по меньшей мере 1 присоединенный гликан, по меньшей мере 2 присоединенных гликана, по меньшей мере 3 присоединенных гликана, по меньшей мере 4 присоединенных гликана, по меньшей мере 5 присоединенных гликанов, по меньшей мере 6 присоединенных гликанов, по меньшей мере 7 присоединенных гликанов, по меньшей мере 8 присоединенных гликанов, по меньшей мере 9 присоединенных гликанов, по меньшей мере 10 присоединенных гликанов, по меньшей мере 11 присоединенных гликанов, по меньшей мере 12 присоединенных гликанов, по меньшей мере 15 присоединенных гликанов, по меньшей мере 20 присоединенных гликанов или по меньшей мере 25 присоединенных гликанов. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 присоединенных гликанов. В некоторых вариантах осуществления гликаны являются N-связанными. В некоторых вариантах осуществления гликаны являются O-связанными. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, содержит как N-, так и O-связанные гликаны.

[115] В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, представляет собой гликозилированный белок. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования, по меньшей мере два сайта гликозилирования, по меньшей мере 3 сайта гликозилирования, по меньшей мере 4 сайта гликозилирования, по меньшей мере 5 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 6 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 7 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 8 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 9 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 10 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 10 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 11 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 12 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 15 сайтов гликозилирования, по меньшей мере 20 сайтов гликозилирования или по меньшей мере 25 сайтов гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере сайт гликозилирования представляет собой сайт N-связанного гликозилирования, например аспарагин в консенсусной последовательности N-связанного гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один сайт гликозилирования представляет собой сайт O-связанного гликозилирования, например серин или треонин. В некоторых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, содержит как по меньшей мере один сайт N-связанного гликозилирования, так и по меньшей мере один сайт O-связанного гликозилирования.

[116] В некоторых вариантах осуществления гликаны составляют по меньшей мере по меньшей мере 0,5%, 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере

20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65% или по меньшей мере 75% от общего веса гликозилированного белка (5% вес/вес или в./в.). В некоторых вариантах осуществления гликаны составляют по меньшей мере 5% от общего веса гликозилированного белка (5% в./в.). В некоторых вариантах осуществления гликаны составляют по меньшей мере 10% от общего веса гликозилированного белка (10% в./в.). Способы определения процента веса белка, приходящегося на гликаны, будут очевидны для специалиста средней квалификации в данной области техники, при этом они предусматривают помимо прочего сравнение ожидаемого веса, полученного исходя из аминокислотной последовательности, с фактическим весом, определенным с помощью способов на основе анализа методом электрофореза, описанных в данном документе.

Эталонные стандарты

[117] В некоторых вариантах осуществления эталонный стандарт подвергают тем же способам получения параллельно с образцом, содержащим белок, представляющий интерес, и анализируют параллельно с образцом, содержащим белок, представляющий интерес. В некоторых вариантах осуществления способы включают сравнение одной или нескольких характеристик белка, представляющего интерес, с таковыми эталонного стандарта. Например, способы могут включать сравнение электрофореграмм белка, представляющего интерес, и эталонного стандарта.

[118] Используемый в данном документе термин «эталонный стандарт» относится к образцу, содержащему белок, который ранее был проанализирован с использованием способов, известных в данной области техники, и характеристики которого известны. Известные характеристики могут быть определены исходя из аминокислотной последовательности эталонного стандарта (например, предсказанная молекулярная масса) или экспериментально (например, профиль электрофореграммы). Эти характеристики могут включать помимо прочего ожидаемую и экспериментально определенную молекулярную массу, электрофореграмму(электрофореграммы), полученную с применением способов, описанных в данном документе, или способов, известных в данной области техники, изоэлектрическую точку, коэффициент экстинкции (показатель того, насколько сильно белок, представляющий интерес, поглощает свет при заданной длине волны), количество сайтов гликозилирования и молекулярную массу присоединенных гликанов. Эталонный стандарт может быть сходным с белком, представляющим интерес, по одной или нескольким характеристикам. Например, как белок, представляющий интерес, так и эталонный стандарт могут представлять собой моноклональные антитела или содержать Fc-домен, иметь одинаковую молекулярную массу и т. п.

[119] В некоторых вариантах осуществления эталонный стандарт содержит белок, представляющий интерес. Например, эталонный стандарт может быть получен из партии белка, представляющего интерес, отличной от партии, из которой был получен образец,

при этом для него ранее были определены характеристики и его хранили в контролируемых условиях для предупреждения деградации.

[120] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлены способы получения образца, содержащего белок, представляющий интерес, и эталонного стандарта для анализа с применением электрофореза, включающие: (а) денатурирование образца и эталонного стандарта; (b) мечение белка, представляющего интерес, и эталонного стандарта флуоресцентной меткой с получением меченого образца и меченого эталонного стандарта; (с) гашение реакции мечения белка, представляющего интерес, и эталонного стандарта, (d) дегликозилирование меченого образца и меченого эталонного стандарта с помощью эндогликозидазы; и (е) проведение электрофореза меченого образца и меченого эталонного стандарта; где образец и эталонный стандарт подвергают мечению и гашению на стадиях (b) и (с) перед дегликозилированием на стадии (d).

[121] В некоторых вариантах осуществления электрофорез представляет собой капиллярный электрофорез на микрочипе (МСЕ), и на выходе получают электрофореграмму. В некоторых вариантах осуществления способы включают определение интенсивности главного пика белка, представляющего интерес, и эталонного стандарта и сравнение значений интенсивности главного пика белка, представляющего интерес, и главного пика эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления главный пик белка, представляющего интерес, или эталонного стандарта соответствуют гликозилированным формам таковых. В некоторых вариантах осуществления главный пик белка, представляющего интерес, или эталонного стандарта соответствуют не гликозилированным формам таковых, т. е. их подвергали дегликозилированию после мечения с применением способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления определение главного пика предусматривает определение высоты главного пика. В некоторых вариантах осуществления определение главного пика предусматривает определение площади главного пика. В некоторых вариантах осуществления определение главного пика предусматривает определение скорректированной по времени площади главного пика, которая представляет собой площадь пика, деленную на время его миграции. В некоторых вариантах осуществления интенсивность главного пика белка, представляющего интерес, находится в диапазоне от 50% до 150%, от 50% до 140%, от 50% до 130%, от 50% до 120%, от 50% до 110%, от 50% до 100%, от 50% до 90%, от 60% до 150%, от 70% до 150%, от 80% до 150%, от 90% до 150%, от 100% до 150%, от 110% до 150%, от 120% до 150%, от 130% до 150%, от 140% до 150%, от 60% до 140%, от 70% до 140%, от 70% до 130%, от 70% до 120%, от 70% до 110%, от 80% до 140%, от 80% до 130%, от 80% до 120%, от 80% до 110%, от 80% до 100%, от 90% до 140%, от 90% до 130%, от 90% до 120%, от 90% до 110% или от 90% до 100% интенсивности главного пика эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления интенсивность главного пика белка, представляющего интерес, находится в диапазоне от 60% до 140%, от 70% до 130%, от 80% до 120% или от 90% до 110% от

интенсивности главного пика эталонного стандарта. В некоторых вариантах осуществления интенсивность главного пика белка, представляющего интерес, находится в диапазоне от 70% до 130% от интенсивности главного пика эталонного стандарта. Посредством определения интенсивности главного пика белка, представляющего интерес, относительно эталонного стандарта можно обеспечить правильное разделение с помощью прибора для СЕ или МСЕ, а также качество данных.

Электрофорез

[122] В данном документе представлены способы анализа образца, содержащего белок, представляющий интерес, полученного с применением способов, описанных в данном документе, с применением электрофореза.

[123] Способы анализа белков, основанные на электрофорезе, включают без ограничения способы на основе геля, такие как электрофорез в полиакриламидном геле с додецил(лаурил)сульфатом натрия (SDS) (SDS-PAGE), электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата лития, электрофорез в свободном потоке, изоэлектрофокусирование, капиллярный гель-электрофорез, капиллярный электрофорез (СЕ) и капиллярный электрофорез на микрочипе (МСЕ).

[124] В некоторых вариантах осуществления электрофорез представляет собой СЕ. В некоторых вариантах осуществления СЕ предусматривает буфер на основе додецилсульфата лития (LDS).

[125] В некоторых вариантах осуществления электрофорез представляет собой МСЕ. Термины «МСЕ» или «капиллярный электрофорез на микрочипе» и «капиллярный электрофорез (СЕ)» относятся к капиллярному электрофорезу (СЕ) и его микрожидкостному аналогу (МСЕ), которые используются для разделения аналитов в образце. Методики МСЕ можно использовать для разделения, идентификации и количественного определения белков, представляющих интерес, примесей в образце белка и анализа продуктов распада белка, представляющего интерес, таких как фрагменты белка. СЕ и МСЕ обеспечивают разделение аналитов на основании электрофоретической подвижности при применении напряжения в отношении образца. Присутствие гелевой матрицы (например, гель-электрофорез) обеспечивает разделение аналитов по размеру, а также по заряду. Примеси в образце включают без ограничения белковые агрегаты, фрагменты белка, белковые мультимеры и связанные с анализом примеси.

[126] При МСЕ денатурированный меченый белок, представляющий интерес, разбавляют и подвергают МСЕ для разделения образца разбавленного белка в системе капиллярного электрофореза на микрочипе с получением электрофореграммы. Поскольку несколько образцов могут анализироваться параллельно на одном и том же микрочипе, способы, основанные на МСЕ, легко адаптировать к высокопроизводительным подходам. Дополнительно, МСЕ является быстрым и использует минимальный объем выборки.

[127] Используемый в данном документе термин «электрофореграмма» представляет собой график, полученный с помощью способов на основе электрофореза, например СЕ или МСЕ. Электрофореграмма содержит пики, соответствующие белку,

представляющему интерес, и примесям.

[128] Способы анализа электрофореграмм известны в данной области техники и включают сравнение положения, размера и площадей под отдельными пиками. Способы вычисления площади пика для электрофореграммы (площади под пиком) известны в данной области техники и включают, например, интегрирование для оценки площади под пиком. Площадь пика можно рассчитать с использованием программного обеспечения, такого как Empower.

[129] Приборы для проведения раскрытых анализов методом МСЕ имеются в продаже. В некоторых вариантах осуществления раскрытые анализы методом МСЕ проводят с применением LabChip GXII, LabChip GXII TouchTM, LabChip GXII TouchTM HT и LabChip для экспресс-анализа белков (LabChip® HT Protein Express Chip).

[130] Приборы для проведения раскрытых анализов методом СЕ также имеются в продаже. Например, анализы методом СЕ можно проводить с применением системы капиллярного электрофореза от Beckman Coulter, такой как система фармацевтического анализа PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System.

[131] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, способы дополнительно включают мечение и электрофорез набора стандартов молекулярной массы белков для оценки размера белка, представляющего интерес. Наборы маркеров молекулярной массы белков будут известны специалистам средней квалификации в данной области техники и включают PageRuler, Mark12, BenchMark, PageRuler High Range и PageRuler Low Range, доступные от ThermoFisher, а также шкалу HT PICO Protein Express из набора Protein Pico Assay Reagent Kit от PerkinElmer. Выбор подходящего набора на основании размера белка, представляющего интерес, будет очевиден для специалиста средней квалификации в данной области техники.

Пути применения

[132] В описании представлены способы определения характеристик белка, представляющего интерес, с применением способов мечения, дегликозилирования и электрофореза, описанных в данном документе.

[133] Анализ белка, представляющего интерес, может включать без ограничения определение количества, положения, высоты, ширины, интенсивности, размера или площади одного или нескольких пиков на электрофореграмме, полученной с помощью СЕ или МСЕ.

[134] Посредством определения числа и положения пиков на электрофореграмме можно определить, присутствуют ли в образце продукты разрушения белка, представляющего интерес, например, в виде пиков с молекулярной массой, меньшей, чем таковая в случае главного пика. Посредством сравнения пиков, полученных при анализе не дегликозилированного белка, представляющего интерес, и белка, представляющего интерес, дегликозилированного и меченого с применением способов, описанных в данном документе, можно определить, присутствуют ли в образце гликозилированные формы белка, представляющего интерес, поскольку главный пик дегликозилированного белка,

представляющего интерес, будет характеризоваться более низкой молекулярной массой, чем главный пик гликозилированного белка, представляющего интерес.

[135] Способы по настоящему изобретению можно применять для анализа стабильности белков, представляющих интерес, в различных условиях. К ним относятся условия хранения белка, представляющего интерес, который был составлен в виде лекарственного вещества или лекарственного продукта. Сравнение числа пиков и площади пиков, например, между эталонным образцом, содержащим белок, представляющий интерес, и полученным из него образцом, подвергнутым стрессовому воздействию, можно использовать для определения стабильности белка, представляющего интерес, во времени и в различных условиях, таких как высокий или низкий рН или воздействие света.

[136] Соответственно, в описании представлены способы определения стабильности белка, представляющего интерес, с применением способов мечения и дегликозилирования белка, представляющего интерес, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способы включают следующее: (a) оказание стрессового воздействия на образец, содержащий белок, представляющий интерес; (b) денатурирование подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца, содержащих белок, представляющий интерес; (c) мечение белка, представляющего интерес, в подвергнутом стрессовому воздействию образце и не подвергнутом стрессовому воздействию образце флуоресцентной меткой с получением меченого подвергнутого стрессовому воздействию образца и меченого не подвергнутого стрессовому воздействию образца; (d) гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки в меченом подвергнутом стрессовому воздействию образце и меченом не подвергнутом стрессовому воздействию образце; (e) дегликозилирование меченого подвергнутого стрессовому воздействию образца и меченого не подвергнутого стрессовому воздействию образца с помощью эндогликозидазы; (f) проведение капиллярного электрофореза на микрочипе (МСЕ) подвергнутого стрессовому воздействию меченого образца и не подвергнутого стрессовому воздействию меченого образца с получением электрофореграмм для подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца; и (g) сравнение электрофореграмм подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца; где подвергнутый стрессовому воздействию образец и не подвергнутый стрессовому воздействию образец подвергают мечению и гашению на стадиях (c) и (d) перед дегликозилированием на стадии (e).

[137] Любые способы стрессового воздействия на белок, представляющий интерес, в образце предусмотрены в рамках способов по настоящему изобретению, в том без ограничения числе таковые с использованием химических веществ, рН, облучения, света, циклов замораживания-оттаивания, лиофилизации и нагревания.

[138] В некоторых вариантах осуществления стрессовое воздействие на образец, содержащий белок, представляющий интерес, предусматривает термическое стрессовое

воздействие на образец. Термическое стрессовое воздействие на образец может предусматривать имитацию условий хранения белка, представляющего интерес, составленного в виде лекарственного вещества или лекарственного продукта, т. е. подвергнутый стрессовому воздействию образец выдерживают при температуре от приблизительно -80°C до -30°C или от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C соответственно. В других вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие на образец предусматривает моделирование условий при обработке и транспортировке образца. В других вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие на образец предусматривает принудительное разрушение образца, например, путем повышения температуры, которой подвергается образец.

[139] В некоторых вариантах осуществления стрессовое воздействие на образец, содержащий белок, представляющий интерес, предусматривает термическое стрессовое воздействие на образец. В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие предусматривает выдерживание образца при температуре от 25°C до 45°C . В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие предусматривает выдерживание образца при 2°C , 4°C , 6°C , 8°C , 10°C , 12°C , 14°C , 16°C , 18°C , 20°C , 22°C , 24°C , 26°C , 28°C , 30°C , 32°C , 35°C , 37°C или 40°C . В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие предусматривает выдерживание образца при 37°C . В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие предусматривает выдерживание образца при температуре от 22°C до 26°C . В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие предусматривает выдерживание образца при 30°C . В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие предусматривает выдерживание белка при температуре от приблизительно 25°C до 45°C . В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие предусматривает выдерживание подвергаемого стрессовому воздействию образца в течение по меньшей мере 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 недель. месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или одного года. В некоторых вариантах осуществления подвергаемый стрессовому воздействию образец выдерживают в течение 2 недель. В некоторых вариантах осуществления подвергаемый стрессовому воздействию образец выдерживают в течение 4 недель.

[140] В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие на образец предусматривает выдерживание образца при температуре от приблизительно 25°C до приблизительно 45°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 5 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 7 недель или по меньшей мере 8 недель. В некоторых вариантах осуществления термическое стрессовое воздействие на образец предусматривает выдерживание образца при температуре от приблизительно 30°C до приблизительно 45°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по

меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 5 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 7 недель или по меньшей мере 8 недель.

[141] В некоторых вариантах осуществления стрессовое воздействие на образец предусматривает по меньшей мере один цикл замораживания/оттаивания. Например, начиная с жидкого образца, снижение температуры до тех пор, пока образец не замерзнет, а затем возвращение образца к температуре, при которой он находится в жидком состоянии перед анализом.

[142] В некоторых вариантах осуществления стрессовое воздействие на образец предусматривает помещение образца в условия хранения. В некоторых вариантах осуществления условия хранения предусматривают температуру от приблизительно -80°C до -30°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяцев или по меньшей мере 30 месяцев. В некоторых вариантах осуществления условия хранения предусматривают температуру от приблизительно 2°C до 8°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев или по меньшей мере 18 месяцев.

[143] В некоторых вариантах осуществления стрессовое воздействие на образец предусматривает механическое перемешивание на образец, например, с применением вихревой или магнитной мешалки.

[144] В некоторых вариантах осуществления стрессовое воздействие на образец предусматривает лиофилизирование и регидратирование образца. Способы лиофилизирования образца, содержащего белок, представляющий интерес, будут известны специалистам средней квалификации в данной области техники и включают, например, сушку замораживанием и сушку распылением.

[145] В некоторых вариантах осуществления стрессовое воздействие на образец предусматривает воздействие на образец света, излучения, молекул синглетного кислорода, свободных радикалов, условий с высоким рН или условий с низким рН. Типичные условия с низким рН включают среди прочего воздействие на образец рН менее 7,0, например рН менее 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,0, 1,5 или 1,0. Типичные условия с высоким рН включают среди прочего воздействие на образец рН более 7,0, например рН более 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 или 10,0.

[146] В некоторых вариантах осуществления стрессовое воздействие на образец предусматривает воздействие на образец света. Воздействие света может предусматривать свет любой длины волны или любого диапазона длин волн. В типичных вариантах осуществления образцы подвергают воздействию холодного белого флуоресцентного света или ближнего ультрафиолетового света. Типичный холодный белый флуоресцентный свет предусматривает свет смешанных длин волн, который

характеризуется коррелированной цветовой температурой (ССТ), составляющей от приблизительно 4100 до приблизительно 4500 градусов Кельвина (К). В некоторых аспектах холодный белый флуоресцентный свет характеризуется ССТ, составляющей 4100 К. В некоторых аспектах воздействие на образец света предусматривает воздействие на образец приблизительно 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3,0 миллиона люкс в час совокупного воздействия холодного белого света. В некоторых аспектах воздействие на образец света предусматривает воздействие на образец совокупного воздействия холодного белого света с интенсивностью приблизительно 1,2 или приблизительно 2,4 миллиона люкс в час. Типичный ближний ультрафиолетовый свет характеризуется длиной волны от приблизительно 300 нм до приблизительно 400 нм. В некоторых аспектах ближний ультрафиолетовый свет характеризуется интегрированной энергией, составляющей от приблизительно 100 ватт-часов/квадратный метр до приблизительно 600 ватт-часов/квадратный метр. В некоторых аспектах ближний ультрафиолетовый свет характеризуется интегрированной энергией, составляющей приблизительно 100, 200, 300, 400, 500 или 600 ватт-часов/квадратный метр.

[147] Уменьшение площади главного пика при сравнении эталонного образца с его версией, подвергнутой стрессу, может, например, указывать на уменьшение количества белка, представляющего интерес, в главном пике в результате разрушения. В некоторых вариантах осуществления площадь главного пика белка, представляющего интерес, подвергнутого стрессовому воздействию, уменьшается на по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35% или по меньшей мере 40% по сравнению с главным пиком белка, представляющего интерес, не подвергнутого стрессовому воздействию. Точно так же увеличение площади пиков низкомолекулярных соединений в эталонном образце, подвергнутом стрессовому воздействию, по сравнению с эталонным образцом может указывать на разрушение белка, представляющего интерес, поскольку количество молекул с более низкой молекулярной массой, представляющих собой продукты разрушения белка, представляющего интерес, увеличивается. В некоторых вариантах осуществления площадь по меньшей мере одного пика низкомолекулярного соединения в случае белка, представляющего интерес, подвергнутого стрессовому воздействию, увеличивается на по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35% или по меньшей мере 40%, по сравнению с по меньшей мере одним пиком низкомолекулярного соединения в случае белка, представляющего интерес, не подвергнутого стрессовому воздействию.

Наборы и готовые изделия

[148] В настоящем изобретении представлены наборы, содержащие один или более раскрытых буферов, ферментов, красителей и эталонных стандартов, применяемых в способах дегликозилирования и мечения, описанных в данном документе. В наборы может входить контейнер для ингредиентов. Буферы могут быть представлены в виде раствора или в лиофилизированной форме. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат второй контейнер, содержащий разбавитель или раствор для восстановления лиофилизованного состава; и, необязательно, инструкции по применению раствора или восстановлению и/или применению лиофилизированных буферов или порошкообразных ингредиентов.

[149] Наборы, описанные в данном документе, могут дополнительно содержать дополнительные реагенты, необходимые для проведения раскрытых анализов методом МСЕ, в том числе один или более из буфера, разбавителя и фильтра. Буфер и реагенты могут находиться во бутылке, флаконе или пробирке.

[150] В некоторых вариантах осуществления наборы содержат инструкции по применению.

[151] В данном описании представлены многочисленные иллюстративные конфигурации, способы, параметры и т. п. Однако следует понимать, что данное описание не предназначено для ограничения объема настоящего изобретения, а представлено в качестве описания иллюстративных вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Реагенты

[152] Материалы и оборудование

[153] Таблица 1. Материалы (также можно использовать эквивалентные элементы)

Элемент	Информация о поставщике и условиях обращения
Пробирки Safe-Lock от Eppendorf, 1,5 мл	VWR, № по кат. 21008-959 или 20901 548
96-луночные планшеты с низкой «юбкой»	PN HSP-9621 от BioRad
Нестерильные микроцентрифужные фильтры Ultrafree MC GV Durapore PVDF от Millipore с размером пор 0,22 мкм или местные аналоги	№ по кат. UFC30GVNB или Thermo Scientific (№ по кат. VWR 66064-450)
Тампоны TX761	VWR PN TWTX761
Термостойкая полипропиленовая пленка VWR® для планшетов с выступающими краями	PN 89087-69
Безворсовая ткань	Wypall L40 PN Os701/7471
Резервуар для реагента от VWR	VWR 89094-674

Фильтры для бутылок Nalgene®, мембрана PES, стерильные	Thermo Scientific (VWR73521-002)
Protein Express LabChip, LabChip® GXII, LabChip® GXII Touch™ HT	PN 760499 или 760528. Хранить при температуре 2-8°C до применения. Обеспечить нагревание чипа в течение 30 минут при комнатной температуре перед первым применением. После достижения комнатной температуры срок годности чипа составляет 30 дней.

[154] Таблица 2. Химические вещества (также можно использовать эквивалентные элементы)

Химическое вещество	Информация о поставщике и условиях обращения
Вода, очищенная MilliQ	-
Эталонный стандарт белка	Эталонные стандарты должны быть специфичными для анализа или экспериментальной программы или должны быть универсальными.
0,2 М фосфата натрия, pH 8,0	№ по кат. VWR J62733
10X восстанавливающее средство (0,5 М дитиотреитола)	Novex Life Technologies PN NP0009. После получения необходимо распределить исходный раствор в виде аликвот по 1 мл и хранить при температуре от 2 до 8°C. Каждый флакон следует использовать один раз, срок годности составляет 6 месяцев.
Йодацетамид (IAM)	Sigma, A3221-10VL; Sigma, I1149 (MW 184,96) (хранить в твердом виде при температуре от 2 до 8°C)
Набор Pico Protein Reagent Kit	Perkin Elmer PN 760498. Набор содержит следующее (цвета крышек флаконов указаны и используются далее): - буфер для мечения Pico 5X (1 флакон) (прозрачный) - лиофилизированный краситель для мечения (4 флакона) (синий) - буфер для образцов (5 флаконов) (белый) - гелевая матрица Protein Gel Matrix (2 флакона) (красный) - набор маркеров массы белков (1 флакон) (желтый) - нижний маркер (1 флакон) (зеленый) - промыочный буфер (4 флакона) (фиолетовый) - стоп-буфер (1 флакон) (оранжевый)

		- DMSO (диметилсульфоксид) (1 флакон) (коричневый) Все реагенты хранятся при температуре от 2°C до 8°C, за исключением лиофилизированного красителя для мечения, который хранится при температуре $\leq -20^\circ\text{C}$ до восстановления. Перед применением набор необходимо выдержать при комнатной температуре не менее 30 минут.
Одноосновный фосфата натрия	моногидрат	№ по кат. Sigma Aldrich 71504; (MW 137,99) Хранить при комнатной температуре
Двухосновный фосфата натрия	гептагидрат	№ по кат. Sigma Aldrich S2429; (MW 268,07) Хранить при комнатной температуре
Додецилсульфат лития (LDS)		№ по кат. Sigma Aldrich L9781; (FW 272.33) (Хранить при комнатной температуре)
70% изопропанол (VWR 89108-160) или изопропанол		для очистки (хранить при комнатной температуре)

[155] Таблица 3. Оборудование

Элемент	Информация о поставщике и условиях обращения
Пипетки с соответствующим объемом и наконечники поставщика или их эквиваленты	VWR, Rainin или Gilson
Микроцентрифуга от Eppendorf, модель 5424 или аналогичная	-
Центрифуга для планшетов, модель 5804, оборудованная для 96-луночных планшетов, или эквивалентная	-
Термомиксер от Eppendorf для пробирок от Eppendorf или циклер Nexus Master Cycler от Eppendorf с крышкой Flex для 96-луночных планшетов или аналогичный	-
Lab Chip GXII от Perkin Elmer или Lab Chip GXII Touch HT	-
Встряхиватель от Vortex или аналогичный	-
Вакуумная аспирационная установка или	Пример установки - наконечник пипетки

аналог	объемом 1000 мкл, прикрепленный к первой части пластиковой трубки, трубка, прикрепленная к закупоренной колбе Эрленмейера в качестве резервуара для жидкости, вторая трубка, соединяющая колбу с источником вакуума. Наконечник пипетки заменяется после каждого этапа очистки (например, цикла аспирации, пробы с помощью системы подачи образца).
--------	---

[156] Таблица 4. Растворы реагентов

Раствор реагента	Приготовление
<p>Невосстанавливающий раствор:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 272 мкл 1 М IAM - 1328 мкл 100 мМ фосфата натрия, 1% LDS, pH 6 - 40 мкл воды MilliQ 	Необходимо приготовить в виде нерасфасованного раствора и перемешать на встряхивателе.
1 М IAM (йодацетамид)	Добавить 303 мкл воды MilliQ во флакон 56 мг IAM. Перемешивать на встряхивателе до полного растворения. Приготовление выполнять непосредственно перед применением.
<p>Восстанавливающий раствор:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 476 мкл 10 х восстанавливающее средство - 1162 мкл 100 мМ фосфата натрия, 1% LDS, pH 9 - 42 мкл воды MilliQ 	Необходимо приготовить в виде нерасфасованного раствора и перемешать на встряхивателе.
<p>Разбавленный стоп-раствор:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 2,5 мкл стоп-буфера (оранжевая крышка) - 17,1 мкл буфера для образцов (белая крышка) - 85,4 мкл воды MilliQ 	Стоп-буферы и буферы для образцов из набора реагентов Pico Protein Reagent Kit
<p>5 мкМ краситель:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 10 мкл 100 мкМ красителя (замороженные аликвоты хранятся при температуре -20°C) - 190 мкл воды MilliQ 	Перемешать на встряхивателе 5 мкМ раствор красителя на высокой скорости для растворения.
100 мкМ краситель	<ul style="list-style-type: none"> - Лиофилизированный краситель для маркировки (синяя крышка, набор реагентов Pico Protein) необходимо центрифугировать при 15000 об./мин. в течение 1 мин. - Добавить 240 мкл DMSO - Перемешать на встряхивателе на высокой скорости до полного растворения.
200 мМ одноосновный моногидрат	- Добавить 5,5 г одноосновного моногидрата

фосфата натрия	фосфата натрия в 200 мл воды MilliQ. - Смешивать до полного растворения и профильтровать через фильтр, встроенный в горловину флакона, с размером пор 0,22 мкм.
200 мМ двухосновный гептагидрат фосфата натрия	- Добавить 10,7 г двухосновного гептагидрата фосфата натрия в 200 мл воды MilliQ. - Смешивать до полного растворения и профильтровать через фильтр, встроенный в горловину флакона, с размером пор 0,22 мкм.
10% LDS (додecilсульфат лития)	- Растворить 1 г LDS в 8 мл MilliQ и QS с MilliQ до общего объема 10 мл. - Профильтровать через фильтр, встроенный в горловину флакона, с размером пор 0,22 мкм.
- 100 мМ фосфата натрия, 1% LDS, pH 6 - 8,18 мл 200 мМ одноосновного моногидрата фосфата натрия - 1,82 мл 200 мМ двухосновного гептагидрата фосфата натрия - 2 мл 10% LDS - 8 мл воды MilliQ	- Смешать раствор с помощью встряхивателя.
- 100 мМ фосфата натрия, 1% LDS, pH 9 - 10 мл 200 мМ двухосновного гептагидрата фосфата натрия - 2 мл 10% LDS - 8 мл воды MilliQ	- Смешать раствор с помощью встряхивателя.

[157] Таблица 5. Краткий обзор способов на основе MCE

Способ на основе MCE	Протокол	Описание	Результаты
Способ А	Пример 2	Без дегликозилирования, общепринятое получение образцов.	Разрешение является недостаточным для получения пика сильно гликозилированного белка; не применим для определения стабильности; интерференция со свободным красителем при < 20 кДа.

Способ В	Пример 3	Дегликозилирование мечением красителем	перед	Хорошее разрешение пиков; дегликозилирование в течение 3 часов, интерференция с пиком PNGазы F, интерференция со свободным красителем при <20 кДа.
Способ С	Пример 4	Дегликозилирование мечения красителем	после	Хорошее разрешение пиков; пик PNGазы F в профиле отсутствует; дегликозилирование в течение 10 мин., разрешение 10-20 кДа, применим для определения стабильности.

[158] Таблица 6. Краткий обзор белков, используемых в примерах

Белок	Используется в примерах	Используется на фиг.	MW (пептидный остов)	Количество N-гликозилирования	Описание
Белок 1	5, 6, 10	2-8, 14-15	49,4	8	Дисульфид-связанный рекомбинантный (Fab') ₂ -подобный белок-ловушка
Белок 2	7	9	48	8	Одноцепочечный рекомбинантный (Fab') ₂ -подобный белок-ловушка
Белок 3	8	10-11	23	1	Выделенный Fc-фрагмент
Белок 4	9	12-13	145	2	mAb IgG4

Пример 2. Протокол капиллярного электрофореза на микрочипе без дегликозилирования (способ А)

[159] В этом протоколе описывается способ получения к анализу исследуемых белков с помощью невосстанавливающего (NR) и восстанавливающего (R) капиллярного электрофореза на микрочипе (MCE) с применением прибора GXII для оценки уровней чистоты и примесей. Эти способы используются для определения характеристик белка или определения уровня фрагментации в образце белка. Эти общепринятые способы выполняют без дегликозилирования.

[160] Процедура

[161] Информацию по алгоритму для этой процедуры см. на фиг. 1.

[162] (1) *Денатурирование*. Эталонный стандарт белка или исследуемый образец разбавляют водой до приблизительно 0,2-2,0 мг/мл. В 96-луночный планшет добавляют образец белка и невосстанавливающий (NR)/восстанавливающий (R) раствор в соотношении по объему 4:1 (объем может варьировать). Запечатывают планшет полипропиленовым уплотнением и нагревают планшет при температуре денатурирования конкретного белка (обычно от 50 до 99°C) в течение оптимального времени (обычно от 1

до 60 минут).

[163] (2) *Мечение*. Готовят 5 мкМ красителя, как описано в таблице 4. Добавляют 5 мкМ красителя в раствор денатурированного белка в объемном соотношении 1:1 (объем можно варьировать). Нагревают 96-луночный планшет в термоциклере при 35°C в течение 30 минут. Чтобы погасить реакцию мечения, добавляют 105 мкл разбавленного стоп-раствора (полученного в соответствии с таблицей 4) и 5 мкл меченого белка в новый 96-луночный планшет и хорошо перемешивают.

[164] (3) *Анализ на GX-II*. Готовят инструмент и микрочип для МСЕ, а также выполняют измерения в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 3. Протокол капиллярного электрофореза на микрочипе с дегликозилированием перед мечением белка (способ В)

[165] Этот способ применяют в отношении гликопротеинов, которые необходимо дегликозилировать перед измерением посредством МСЕ. Если не указано иное, все протоколы, химические вещества, реагенты и анализы соответствуют описанным в примерах 1-2.

[166] Таблица 7. Дополнительные реагенты

Реагент	Информация о поставщике
PNГаза F	New England BioLabs NEB № P0704L
Буфер GlycoBuffer 2 (10X)	New England BioLabs, № B3704
Поверхностно-активное вещество RapiGest SF	Waters, PN 186001861
Бикарбонат аммония (ABC)	Sigma (Fluka), № по кат.: 40867

[167] Процедура

[168] (1) *Дегликозилирование*. Разбавляют в общей сложности 100 мкг образца белка с помощью 0,1% RapiGest SF до 90 мкл. Вес белка можно определить с помощью способов, основанных на УФ-излучении. Добавляют 10 мкл исходного раствора NEB PNGазы F и готовят 100 мкл смеси для дегликозилирования с последующей обработкой на встряхивателе и осаждением. Смесь инкубируют при 37°C в течение 3 часов на нагревательном блоке при встряхивании со скоростью 400 оборотов в минуту (об./мин.).

[169] (2) *Денатурирование*. Проводят денатурирование вышеупомянутого дегликозилированного образца, как описано в примере 2.

[170] (3) *Мечение*. Необходимо выполнить мечение денатурированного образца, как описано в примере 2.

[171] (4) *Анализ на GX-II*. Готовят инструмент и микрочип для МСЕ, а также выполняют измерения в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 4. Протокол капиллярного электрофореза на микрочипе с дегликозилированием после мечения белка (способ С)

[172] Этот способ применяют в отношении гликопротеинов, которые необходимо дегликозилировать перед измерением посредством МСЕ. Если не указано иное, все протоколы, химические вещества, реагенты и анализы соответствуют описанным в примерах 1-3.

[173] Схема протокола дегликозилирования после мечения белка представлена на фиг. 1.

[174] Таблица 8. Дополнительные реагенты

Реагент	Информация о поставщике
PNГазы F Rapid™ (невосстанавливающий формат)	New England BioLabs NEB № P0710
5x буфер PNGазы F Rapid™ (невосстанавливающий формат)	New England BioLabs NEB № B0717S

[175] Процедура

[176] (1) *Денатурирование*. Разбавляют и денатурируют образец, как описано в примере 2.

[177] (2) *Мечение*. Готовят 5 мкМ красителя, как описано в таблице 4. Смешивают 5 мкМ красителя и вышеупомянутый раствор денатурированного белка в объемном соотношении 1:1. Например, если объем образца составляет 10 мкл, необходимо добавить 10 мкл красителя с концентрацией 5 мкМ. Запечатывают 96-луночный планшет полипропиленовым уплотнением и нагревают в термоциклере при 35°C в течение 30 минут. Для гашения реакции мечения необходим неиспользованный 96-луночный планшет. Добавляют 2,5 мкл стоп-буфера (флакон с оранжевой крышкой из набора реагентов Pico Protein Reagent Kit, необходимо использовать исходный раствор из набора) в лунки пустого планшета в соответствии со схемой анализа образцов. Переносят 2,5 мкл меченого образца в лунки планшета, содержащие стоп-раствор. С помощью пипетки в каждую лунку вносят образец смеси и выдерживают по меньшей мере 3 минуты.

[178] (3) *Дегликозилирование*. Добавляют в каждую лунку 3 мкл воды MilliQ и 2 мкл 5x буфера PNGазы Rapid™ (невосстанавливающий формат из NEB), с получением объема реакционной смеси 10 мкл. Добавляют в каждую лунку 1-4 мкл PNGазы Rapid™ (невосстанавливающий формат из NEB). Запечатывают 96-луночный планшет полипропиленовым уплотнением и нагревают в термоциклере при 50°C в течение 10-30 минут. После дегликозилирования добавляют в каждую лунку 17 мкл буфера для образцов (флакон с белой крышкой из набора реагентов Pico Protein Reagent Kit) и 80 мкл воды MilliQ.

[179] (4) *Анализ на GX-II*. Готовят инструмент и микрочип для MCE, а также выполняют измерения в соответствии с инструкциями производителя.

Пример 5. Сравнение отсутствия дегликозилирования и наличия дегликозилирования перед мечением белка при использовании сильно гликозилированного белка, содержащего сиаловую кислоту

[180] Белок 1 представляет собой рекомбинантный слитый белок, связанный дисульфидной связью, размер которого составляет 49 кДа по массе пептида и который содержит 8 предполагаемых сайтов N-гликозилирования (необходимо отметить, что не все сайты должны быть гликозилированы).

[181] Одной из целей была разработка способа, основанного на капиллярном электрофорезе на микрочипе, для определения характеристик и мониторинга

низкомолекулярных (LMW) фрагментов сильно гликозилированного белка, содержащего сиаловую кислоту (например, белка 1), для поисковых исследований стабильности и исследований контроля качества (QC).

[182] Характеристики белка 1 показаны в таблице 9 ниже.

[183] Таблица 9. Молекулярные свойства белка 1

Молекулярная масса без гликанов (Intact MS)	49 кДа
Молекулярная масса с гликанами (SEC-MALS)	64 кДа
Предполагаемые сайты N-связанного гликозилирования	8

[184] Сокращения. Intact MS - масс-спектрометрия интактного белка; SEC-MALS - эксклюзионная хроматография с рассеиванием лазерного излучения с кратными углами.

[185] Сравнение протокола без дегликозилирования (способ А, пример 2) и протокола с дегликозилированием перед мечением (способ В, пример 3) показано на фиг. 1. Сравнение электрофореграмм белка 1, полученных по способу А и способу В, показано на фиг. 2 для невозстанавливающих (NR) условий, а на фиг. 4 - для восстанавливающих (R) условий соответственно. В NR условиях в результате применения способа А (без дегликозилирования) на электрофореграмме наблюдался широкий пик без разрешения пиков (т. е. без разрешения основного пика, пиков высокомолекулярных соединений (HMW) и пиков низкомолекулярных соединений (LMW)). Кроме того, появился пик в положении, соответствующем области гораздо более высокой молекулярной массы (MW) (70-120 кДа), чем ожидалось при значении 64 кДа, полученном на основании ортогонального способа. При анализе методом МСЕ оценка размера может быть неточной, при этом ошибка больше в случае, если белок гликозилирован (описано Engel et al. в *Electrophoresis*, 2015 Aug; 36(15):1754-8). Кроме того, наблюдалась интерференция с пиком свободного красителя при < 20 кДа, что может маскировать любые пики LMW ниже 20 кДа.

[186] Напротив, в результате способа В, где дегликозилирование происходит перед мечением (пример 3), наблюдается разрешение пиков и разрешение между пиками проходит до базовой линии (основной пик, пики HMW, LMW). Основной пик появился близко к ожидаемой MW (приблизительно 49 кДа). Протокол применим для определения стабильности и более точен в отношении определения размера молекул. Однако протокол способа В также требует 3 часов дегликозилирования, что ограничивает общую производительность анализа. Кроме того, пик PNGазы (приблизительно 36 кДа) интерферирует с пиками LMW 1 и 2 (пики примесей, обусловленные фрагментами белка 1). Особенно в случае образцов белка 1, подвергшихся термическому стрессовому воздействию, пик LMW 1 увеличивается и расширяется, сливаясь с пиком PNGазы (фиг. 3). Другим близко расположенным артефактом является таковой, обусловленный интерференцией с пиком свободного красителя при < 20 кДа. Сочетание этих артефактов может привести к неточному интегрированию при количественном определении примесей и ограничивает возможность применения анализа для определения стабильности.

[187] Аналогичные наблюдения были сделаны в случае восстанавливающих условий (фиг. 4): дегликозилирование гликопротеинов требуется для точного определения

размера, разделения и разрешения основного пика, пиков LMW и HMW.

Пример 6. Дегликозилирование после мечения белка при использовании сильно гликозилированного белка, содержащего сиаловую кислоту

[188] Сравнение протоколов с дегликозилированием до мечения (способ В) и после мечения (способ С) показано на фиг. 1.

[189] Для разработки протокола с дегликозилированием после мечения были оптимизированы условия реакции дегликозилирования, так как изначально наблюдалось неполное удаление пика гликозилированного соединения при 30-минутной реакции дегликозилирования. Такие условия, как температура, время, концентрация и буфер, варьировали для определения оптимального способа дегликозилирования белка 1.

[190] В результате оптимизации для удаления пика не полностью дегликозилированного соединения на электрофореграмме белка 1 в NR условиях были получены некоторые улучшения протокола. Они включали применение PNGазы F Rapid™ NEB и проведение дегликозилирования при повышенной температуре, 50°C в течение 10 минут (при применении обычной PNGазы F требуется 3 часа инкубации при 37°C), повышение концентрации эндогликозидазы и добавление буфера для гликопротеинов из набора PNGазы NEB.

[191] Эксперименты показали, что увеличение времени реакции не обеспечивало явного улучшения в отношении дегликозилирования. На фиг. 5 показаны электрофореграммы, полученные с применением белка 1 с 1 мкл или 2 мкл PNGазы F Rapid™ (невосстанавливающий формат, NEB P0711) при 50°C, с варьированием времени реакции от 10 до 30 минут. Как видно на фиг. 5, очевидного улучшения (т. е. уменьшения не полностью дегликозилированного пика) при времени реакции более 10 минут не наблюдали.

[192] Увеличение концентрации PNGазы F Rapid™ обеспечило улучшение дегликозилирования. При применении протокола дегликозилирования после мечения, в реакционную смесь для дегликозилирования добавляли 1, 2, 3 или 4 мкл PNGазы F Rapid™, и реакцию проводили при 50°C в течение 10 минут. Результаты показаны на фиг. 6 и фиг. 7. Как видно на вставке к фиг. 6, увеличение концентрации PNGазы F Rapid™ обеспечило уменьшение плечевого пика, обусловленного неполным дегликозилированием белка 1.

[193] Добавление 1-4 мкл PNGазы F Rapid™ обеспечивало получение надежных результатов. Электрофореграммы, полученные с применением эталонного белка 1, дегликозилированного с применением 1, 2, 3 или 4 мкл PNGазы F Rapid™, показаны на фиг. 7. Площадь под указанными пиками была интегрирована с помощью Empower, и результаты представлены в таблице 10 ниже.

[194] Таблица 10. Интеграция пиков белка 1, полученных с применением различных количеств PNGазы F Rapid™

PNGаза Rapid™	LMW2-5	LMW 1	MP	HMW
1 мкл	2,27	4,09	93,01	0,62

2 мкл	1,94	4,23	93,24	0,60
3 мкл	1,71	4,05	93,75	0,50
4 мкл	1,78	4,10	93,38	0,75
% RSD	12,95	1,90	0,33	16,64

[195] % RSD обозначает относительное стандартное отклонение в процентах.

[196] Результаты интегрирования показали, что, несмотря на снижение плечевого пика после главного пика (не полностью дегликозилированный белок 1), которое наблюдалось при более высокой концентрации PNGазы F Rapid™, общий процент интеграции главного пика (MP) имел наиболее высокое значение при примерно 3 мкл. При количестве PNGазы от 1 мкл до 4 мкл % RSD для MP составлял 0,33%, что свидетельствует о том, что применение PNGазы F Rapid™ в концентрациях 1-4 мкл на реакцию обеспечивает получение надежных результатов. Следуя этой тенденции, ожидается, что применение большего количества PNGазы Rapid™ даст аналогичные результаты.

[197] Способ С, где дегликозилирование происходит после мечения, обеспечивает как точность этого анализа методом МСЕ, так и возможность его применения для определения стабильности. Белок 1 подвергали стрессовому воздействию, выдерживая раствор белка при 37°C в течение 4 недель (эталонный стандарт, подвергнутый стрессовому воздействию, или «SRS», «37°C, 4 недели» в таблицах 11 и 12, по сравнению с «RS» или эталонным стандартом без стрессового воздействия), и анализировали с применением протокола для дегликозилирования после мечения и МСЕ, описанного в данном документе. Такой подвергнутый стрессовому воздействию белок 1 сравнивали с не подвергнутым стрессовому воздействию белком 1 (время, равное 0 или t₀, т. е. без выдерживания при 37°C). Электрофореграммы получали для подвергнутого стрессовому воздействию и не подвергнутого стрессовому воздействию белка 1 (фиг. 8), и указанные пики были интегрированы с применением Empower. Измерения повторяли в трех повторностях (S1-S3), и результаты показаны в таблицах 11 и 12 ниже.

[198] Таблица 11. Сравнение подвергнутого стрессовому воздействию (SRS) и не подвергнутого стрессовому воздействию (RS) белка 1 с применением протокола с дегликозилированием после мечения

Стресс		LMW5 (%)	LMW4 (%)	LMW3 (%)	LMW2 (%)	LMW1 (%)	MP (%)	HMW1 (%)	HMW2 (%)
RS (t ₀)	S1	0,11	0,20	0,75	0,81	4,22	93,36	0,54	-
	S2	0,07	0,17	0,70	0,80	4,22	93,57	0,48	-
	S3	0,12	0,17	0,73	0,81	4,21	93,38	0,57	-
SRS (37°C, 4w)	S1	0,08	0,64	0,71	1,37	5,46	89,25	2,34	0,15
	S2	0,10	0,63	0,71	1,39	5,52	89,25	2,19	0,20
	S3	0,16	0,68	0,68	1,35	5,45	89,63	1,87	0,18

[199] Таблица 12. Процентное относительное стандартное отклонение (% RSD) для подвергнутого стрессовому воздействию и не подвергнутого стрессовому воздействию белка 1 (N=3)

		LMW (%)	MP (%)	HMW (%)
RS (t ₀)	Среднее значение	6,03	93,36	0,54

(способ С, пример 4) как в невосстанавливающих, так и в восстанавливающих условиях. Как видно на фиг. 9, при отсутствии дегликозилирования имел место только широкий пик без разделения, появляющийся в области MW (90-140 кДа), который намного превышал теоретическое значение (приблизительно 48 кДа). Напротив, при наличии дегликозилирования главный пик получали вблизи ожидаемой MW (48 кДа), и оно обеспечивало четкое разрешение пиков LMW. Кроме того, на электрофореграмме не появлялся пик PNGазы (~ 36 кДа).

Пример 8. Сравнение результатов МСЕ, полученных с дегликозилированием и без него, при использовании белка 3

[206] Белок 3 представляет собой рекомбинантную субъединицу Fc IgG 1 человека, расщепленную в определенном сайте рекомбинантной цистеиновой протеазой. Белок имеет предполагаемую молекулярную массу 23 кДа. Белок имеет один сайт N-гликозилирования.

[207] Электрофореграммы МСЕ получали с применением протокола без дегликозилирования (способ А, пример 2) и с дегликозилированием после мечения (способ С, пример 4) в невосстанавливающих условиях. Результаты можно увидеть на фиг. 10. В профиле, полученном при отсутствии дегликозилирования, были обнаружены два главных пика (MP), которые представляют негликозилированную популяцию (MP1, слева) и гликозилированную популяцию (MP2, справа) в исходном образце. В профиле, полученном при наличии дегликозилирования, наблюдался только пик негликозилированного соединения и обеспечивалось разрешение нескольких пиков HMW. Такое же сравнение также проводили в восстанавливающих условиях (фиг. 11).

Пример 9. Оценка стабильности моноклонального антитела

[208] Белок 4 представляет собой моноклональное антитело на основе IgG4 человека с молекулярной массой 145 кДа и двумя сайтами N-связанного гликозилирования.

[209] Электрофореграммы МСЕ получали для образцов белка 4, полученных с применением протокола без дегликозилирования (способ А, на фиг. 12 и 13) и с применением протокола с дегликозилированием после мечения (способ С, на фиг. 12 и 13). Белок анализировали с применением денатурации как в невосстанавливающих условиях (фиг. 12), так и в восстанавливающих условиях (фиг. 13). Как видно на фиг. 13, дегликозилирование обеспечивает смещение от главного пика гликозилированного соединения (GMP) к главному пику дегликозилированного соединения (DGMP) с более низкой молекулярной массой в результате удаления гликанов. На фиг. 13 видно, что дегликозилирование обеспечивает уменьшение размера пика тяжелой цепи (HC), как видно при сравнении пиков дегликозилированной тяжелой цепи (DGHC) и гликозилированной тяжелой цепи (FGHC).

Пример 10. Оценка стабильности белка 1, подвергнутого стрессовому воздействию светом

[210] Белок 1 подвергали стрессовому воздействию светом, облучая раствор белка

холодным белым (CW) светом флуоресцентной лампы с суммарной экспозицией 1,2 и 2,4 миллиона люкс в час (MLH) (Фиг. 14) или при воздействии суммарной энергии света в ближнем ультрафиолетовом спектре (UVA) с энергией 200 и 400 ватт-часов/квадратный метр (фиг. 15). Образцы анализировали с применением протокола с дегликозилированием после мечения (способ С) и МСЕ, как описано в примерах 1 и 4. Подвергнутые стрессовому воздействию образцы белка 1 сравнивали с контрольным не подвергнутым стрессовому воздействию образцом белка 1 (который инкубировали в тех же условиях, но накрывали алюминиевой фольгой). Электрофореграммы получали для подвергнутого стрессовому воздействию и не подвергнутого стрессовому воздействию белка 1, и указанные пики были интегрированы с применением Empower. Результаты представлены в таблице 13. Воздействие как CW, так и UVA приводило к небольшому увеличению пиков LMW и значительному увеличению пиков HMW, что может быть связано с иницируемым светом образованием димеров и мультимеров с ковалентной связью. Результаты показывают, что этот способ применим для определения стабильности и позволяет оценивать степень фрагментации и образования HMW с ковалентной связью для белка в условиях стресса.

[211] Таблица 14. Сравнение белка 1, подвергнутого стрессовому воздействию светом и не подвергнутого стрессовому воздействию светом, с применением протокола с дегликозилированием после мечения (способ С).

Условия стрессового воздействия светом	LMW (%)	MP (%)	HMW (%)
Не подвергнутый стрессовому воздействию	5,01	93,61	1,38
CW 1,2 миллиона люкс в час	6,61	77,27	16,12
CW 2,4 миллиона люкс в час	7,54	69,96	22,50
UVA 200 Вт часов/м ²	6,48	84,92	8,60

В частных вариантах осуществления настоящее изобретение может относиться к следующим вариантам:

1. Способ анализа образца, содержащего белок, представляющий интерес, включающий:

денатурирование образца;

мечение образца флуоресцентной меткой с получением меченого образца;

гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки в меченом образце;

дегликозилирование меченого образца с помощью эндогликозидазы; и

проведение электрофореза меченого образца;

где образец подвергают денатурации, мечению и гашению на стадиях (a) - (c) перед дегликозилированием на стадии (d).

2. Способ согласно варианту 1, где белок, представляющий интерес, содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования.

3. Способ согласно варианту 1 или 2, где белок, представляющий интерес, представляет собой гликозилированный белок.

4. Способ согласно варианту 3, где гликозилированный белок содержит по меньшей мере один присоединенный гликан.
5. Способ согласно любому из вариантов 1-4, где белок, представляющий интерес, предусматривает антигенсвязывающий домен.
6. Способ согласно варианту 5, где белок, представляющий интерес, предусматривает антитело, фрагмент антитела или scFv.
7. Способ согласно любому из вариантов 1-6, где белок, представляющий интерес, предусматривает Fc-домен.
8. Способ согласно любому из вариантов 1-7, где белок, представляющий интерес, предусматривает слитый белок, содержащий рецептор.
9. Способ согласно варианту 8, где слитый белок, содержащий рецептор, представляет собой слитый белок, содержащий рецептор и Fc, или растворимый слитый белок, содержащий TCR и Fc.
10. Способ согласно варианту 8 или 9, где слитый белок, содержащий рецептор, представляет собой белок-ловушку или белок-мини-ловушку.
11. Способ согласно любому из вариантов 1-10, где белок, представляющий интерес, представляет собой рекомбинантный белок человека.
12. Способ согласно любому из вариантов 2-11, где сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность Asn-X-Ser/Thr.
13. Способ согласно любому из вариантов 4-12, где по меньшей мере один присоединенный гликан является N-связанным.
14. Способ согласно варианту 13, где по меньшей мере один присоединенный гликан является N-связанным с аспарагином в гликозилированном белке.
15. Способ согласно любому из вариантов 1-14, где эндогликозидаза катализирует дегликозилирование N-связанных гликанов.
16. Способ согласно любому из вариантов 1-15, где эндогликозидаза выбрана из группы, состоящей из пептид-N-гликозидазы F (PNGаза F), эндогликозидазы H (Endo H), эндогликозидазы S (Endo S), эндогликозидазы D, эндогликозидазы F1, эндогликозидазы F2 и эндогликозидазы F4.
17. Способ согласно любому из вариантов 1-15, где эндогликозидаза представляет собой PNGазу F.
18. Способ согласно варианту 17, где PNGаза F представляет собой PNGазу F Rapid.
19. Способ согласно варианту 18, где PNGаза F Rapid является невосстанавливающей.
20. Способ согласно любому из вариантов 17-19, где дегликозилирование образца предусматривает нагревание образца до приблизительно 50°C в течение 10 минут.
21. Способ согласно любому из вариантов 1-20, где дегликозилирование образца предусматривает реакционную смесь, содержащую 0,2-1,5 мг меченого белка, представляющего интерес, и 1-5 мкл PNGазы F Rapid в реакционном объеме 10 мкл,

исключая объем PNGазы F Rapid.

22. Способ согласно варианту 21, где реакционная смесь содержит 0,2 мг меченого белка, представляющего интерес.

23. Способ согласно варианту 21, где реакционная смесь содержит 5 мкл PNGазы F Rapid.

24. Способ согласно любому из вариантов 21-23, где реакционная смесь содержит буфер.

25. Способ согласно любому из вариантов 4-11, где по меньшей мере один гликан представляет собой O-связанный гликан.

26. Способ согласно варианту 25, где эндогликозидаза катализирует дегликозилирование O-связанных гликанов.

27. Способ согласно варианту 25 или 26, где эндогликозидаза предусматривает эндо- α -N-ацетилгалактозаминидазу (O-гликозидазу).

28. Способ согласно любому из вариантов 1-27, где мечение образца флуоресцентной меткой предусматривает нагревание образца до приблизительно 35°C в течение 10-30 минут.

29. Способ согласно любому из вариантов 1-27, где мечение образца флуоресцентной меткой предусматривает нагревание образца до приблизительно 35°C в течение приблизительно 15 минут.

30. Способ согласно любому из вариантов 1-29, где образец подвергают денатурации с применением восстанавливающего раствора.

31. Способ согласно варианту 30, где восстанавливающий раствор содержит дитиотреитол (DTT).

32. Способ согласно любому из вариантов 1-29, где образец подвергают денатурации с применением невосстанавливающего раствора.

33. Способ согласно варианту 32, где невосстанавливающий раствор содержит йодацетамид (IAM).

34. Способы согласно любому из вариантов 1-33, где денатурирование образца предусматривает нагревание образца до температуры от 40°C до 99°C в течение от 1 минуты до 5 часов.

35. Способы согласно любому из вариантов 1-33, где денатурирование образца предусматривает нагревание образца до температуры от 50°C до 99°C в течение от 1 до 60 минут.

36. Способ согласно любому из вариантов 1-35, где гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки предусматривает добавление стоп-раствора.

37. Способ согласно любому из вариантов 1-36, дополнительно включающий проведение анализа эталонного стандарта параллельно с образцом.

38. Способ согласно любому из вариантов 1-37, где электрофорез выбран из группы, состоящей из гель-электрофореза, изоэлектрического фокусирования, капиллярного электрофореза (CE) или капиллярного электрофореза на микрочипе (MCE).

39. Способ согласно любому из вариантов 1-37, где электрофорез представляет собой МСЕ.

40. Способ согласно варианту 39, где МСЕ проводят с применением прибора для МСЕ.

41. Способ согласно любому из вариантов 1-40, где способ приводит в результате к уменьшению интерференции со свободным красителем в диапазоне менее 20 кДа и уменьшению или устранению пика эндогликозидазы на электрофореграмме по сравнению с электрофореграммой, полученной при использовании образца, меченного после дегликозилирования.

42. Способ согласно варианту 41, где пик эндогликозидазы уменьшается на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 20%, на по меньшей мере 30%, на по меньшей мере 40%, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% по сравнению с электрофореграммой, полученной при использовании образца, меченного после дегликозилирования.

43. Способ согласно варианту 41, где на электрофореграмме отсутствует пик эндогликозидазы по сравнению с электрофореграммой, полученной при использовании образца, меченного после дегликозилирования.

44. Способ определения стабильности белка, представляющего интерес, включающий:

оказание стрессового воздействия на образец, содержащий белок, представляющий интерес;

денатурирование подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца, содержащих белок, представляющий интерес;

мечение подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца флуоресцентной меткой с получением меченого подвергнутого стрессовому воздействию образца и меченого не подвергнутого стрессовому воздействию образца;

гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки в меченом подвергнутом стрессовому воздействию образце и меченом не подвергнутом стрессовому воздействию образце;

дегликозилирование меченого подвергнутого стрессовому воздействию образца и меченого не подвергнутого стрессовому воздействию образца с помощью эндогликозидазы;

проведение капиллярного электрофореза на микрочипе (МСЕ) для меченого подвергнутого стрессовому воздействию образца и меченого не подвергнутого стрессовому воздействию образца с получением электрофореграмм для подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца; а также

сравнение электрофореграмм подвергнутого стрессовому воздействию образца и не подвергнутого стрессовому воздействию образца с определением таким образом стабильности белка, представляющего интерес;

где подвергнутый стрессовому воздействию образец и не подвергнутый стрессовому воздействию образец подвергают денатурации, мечению и гашению на стадиях (b) - (d) перед дегликозилированием на стадии (e).

45. Способ согласно варианту 44, где стрессовое воздействие на образец предусматривает термическое стрессовое воздействие на образец.

46. Способ согласно варианту 45, где термическое стрессовое воздействие на образец предусматривает выдерживание образца при температуре от приблизительно 30°C до приблизительно 45°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 4 недель, по меньшей мере 5 недель, по меньшей мере 6 недель, по меньшей мере 7 недель или по меньшей мере 8 недель.

47. Способ согласно варианту 44, где стрессовое воздействие на образец предусматривает по меньшей мере один цикл замораживания/оттаивания.

48. Способ согласно варианту 44, где стрессовое воздействие на образец предусматривает помещение образца в условия хранения.

49. Способы согласно варианту 48, где условия хранения предусматривают температуру от приблизительно -80°C до -30°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяцев или по меньшей мере 30 месяцев.

50. Способы согласно варианту 48, где условия хранения предусматривают температуру от приблизительно 2°C до 8°C в течение по меньшей мере 1 недели, по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 3 недель, по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев или по меньшей мере 18 месяцев.

51. Способ согласно варианту 44, где стрессовое воздействие на образец предусматривает механическое перемешивание образца.

52. Способ согласно варианту 44, где стрессовое воздействие на образец предусматривает лиофилизирование и регидратирование образца.

53. Способ согласно варианту 44, где стрессовое воздействие на образец предусматривает воздействие на образец света, излучения, молекул синглетного кислорода, свободных радикалов, условий с высоким рН или условий с низким рН.

54. Способ согласно любому из вариантов 44-53, где белок, представляющий интерес, содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования.

55. Способ согласно любому из вариантов 44-53, где белок, представляющий интерес, представляет собой гликозилированный белок.

56. Способ согласно варианту 55, где гликозилированный белок содержит по

меньшей мере один присоединенный гликан.

57. Способ согласно любому из вариантов 44-56, где белок, представляющий интерес, предусматривает антигенсвязывающий домен.

58. Способ согласно варианту 57, где белок, представляющий интерес, предусматривает антитело, фрагмент антитела или scFv.

59. Способ согласно любому из вариантов 44-58, где белок, представляющий интерес, предусматривает Fc-домен.

60. Способ согласно любому из вариантов 44-59, где белок, представляющий интерес, предусматривает слитый белок, содержащий рецептор.

61. Способ согласно варианту 60, где слитый белок, содержащий рецептор, представляет собой слитый белок, содержащий рецептор и Fc, или растворимый слитый белок, содержащий TCR и Fc.

62. Способ согласно варианту 60 или 61, где слитый белок, содержащий рецептор, представляет собой белок-ловушку или белок-мини-ловушку.

63. Способ согласно любому из вариантов 44-62, где белок, представляющий интерес, представляет собой рекомбинантный белок человека.

64. Способ согласно любому из вариантов 54-63, где сайт гликозилирования содержит консенсусную последовательность Asn-X-Ser/Thr.

65. Способ согласно любому из вариантов 56-64, где по меньшей мере один присоединенный гликан является N-связанным.

66. Способ согласно варианту 65, где по меньшей мере один присоединенный гликан является N-связанным с аспарагином в гликозилированном белке.

67. Способ согласно любому из вариантов 44-66, где эндогликозидаза катализирует дегликозилирование N-связанных гликанов.

68. Способ согласно любому из вариантов 44-67, где эндогликозидаза выбрана из группы, состоящей из пептид-N-гликозидазы F (PNGаза F), эндогликозидазы H (Endo H), эндогликозидазы S (Endo S), эндогликозидазы D, эндогликозидазы F1, эндогликозидазы F2 и эндогликозидазы F4.

69. Способ согласно любому из вариантов 44-67, где эндогликозидаза представляет собой PNGазу F.

70. Способ согласно варианту 69, где PNGаза F представляет собой PNGазу F Rapid.

71. Способ согласно варианту 70, где PNGаза F Rapid является невосстанавливающей.

72. Способ согласно любому из вариантов 44-71, где дегликозилирование подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает нагревание образцов до приблизительно 50°C в течение 10 минут.

73. Способ согласно любому из вариантов 44-72, где дегликозилирование подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает реакционную смесь для каждого образца, содержащую 0,2-1,5 мг меченого белка,

представляющего интерес, и 1-5 мкл PNGазы F Rapid в реакционном объеме 10 мкл, исключая объем PNGазы F Rapid.

74. Способ согласно варианту 73, где реакционная смесь для каждого из подвергнутого и не подвергнутого стрессовому воздействию образцов содержит 5 мкл PNGазы F Rapid.

75. Способ согласно варианту 73 или 74, где каждый из подвергнутого и не подвергнутого стрессовому воздействию образцов содержит 0,2 мг меченого белка, представляющего интерес.

76. Способ согласно любому из вариантов 73-75, где реакционная смесь для каждого из подвергнутого и не подвергнутого стрессовому воздействию образцов содержит буфер.

77. Способ согласно любому из вариантов 44-63, где по меньшей мере один гликан представляет собой O-связанный гликан.

78. Способ согласно варианту 77, где эндогликозидаза катализирует дегликозилирование O-связанных гликанов.

79. Способ согласно варианту 77 или 78, где эндогликозидаза предусматривает эндо- α -N-ацетилгалактозаминидазу (O-гликозидазу).

80. Способ согласно любому из вариантов 44-79, где мечение подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов флуоресцентной меткой предусматривает нагревание каждого образца до приблизительно 35°C в течение 10-30 минут.

81. Способ согласно любому из вариантов 44-79, где мечение подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов флуоресцентной меткой предусматривает нагревание каждого образца до приблизительно 35°C в течение приблизительно 15 минут.

82. Способ согласно любому из вариантов 44-81, где подвергнутые и не подвергнутые стрессовому воздействию образцы подвергаются денатурации с применением восстанавливающего раствора.

83. Способ согласно варианту 82, где восстанавливающий раствор содержит дитиотреитол (DTT).

84. Способ согласно любому из вариантов 44-81, где подвергнутые и не подвергнутые стрессовому воздействию образцы подвергаются денатурации с применением невосстанавливающего раствора.

85. Способ согласно варианту 84, где невосстанавливающий раствор содержит йодацетамид (IAM).

86. Способ согласно любому из вариантов 44-85, где денатурирование подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает нагревание образцов до температуры от 40°C до 99°C в течение от 1 минуты до 5 часов.

87. Способ согласно любому из вариантов 44-85, где денатурация подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает нагревание

образцов до температуры от 50°C до 99°C в течение от 1 до 60 минут.

88. Способ согласно любому из вариантов 44-87, где гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки предусматривает добавление стоп-раствора.

89. Способ согласно любому из вариантов 44-88, дополнительно включающий проведение анализа эталонного стандарта параллельно с подвергнутыми и не подвергнутыми стрессовому воздействию образцами.

90. Способ согласно любому из вариантов 44-89, где сравнение электрофореграмм подвергнутых и не подвергнутых стрессовому воздействию образцов предусматривает сравнение числа, высоты, положения, площади пиков или их комбинации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ анализа образца, содержащего белок, представляющий интерес, где белок, представляющий интерес, представляет собой терапевтический белок, содержащий Fc-домен, при этом способ включает:

денатурирование образца;
мечение терапевтического белка флуоресцентной меткой с получением меченого образца;
гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки в меченом образце;
дегликозилирование меченого образца с помощью эндогликозидазы с получением дегликозилированного меченого образца; и
проведение электрофореза дегликозилированного меченого образца;
где образец подвергают денатурации, мечению и гашению на стадиях (а) - (с) перед дегликозилированием на стадии (d).

2. Способ по п. 1, где терапевтический белок содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где терапевтический белок представляет собой гликозилированный белок, содержащий по меньшей мере один присоединенный гликан.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где терапевтический белок содержит антигенсвязывающий домен.

5. Способ по п. 4, где терапевтический белок содержит антитело.

6. Способ по любому из пп. 1-4, где терапевтический белок содержит слитый белок, содержащий рецептор.

7. Способ по п. 6, где слитый белок, содержащий рецептор, представляет собой слитый белок, содержащий рецептор и Fc, или растворимый слитый белок, содержащий TCR и Fc.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где терапевтический белок представляет собой рекомбинантный белок человека.

9. Способ по п. 3, где по меньшей мере один присоединенный гликан является N-связанным.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где эндогликозидаза катализирует дегликозилирование N-связанных гликанов; и/или эндогликозидаза выбрана из группы, состоящей из пептид-N-гликозидазы F (PNGаза F), эндогликозидазы H (Endo H), эндогликозидазы S (Endo S), эндогликозидазы D, эндогликозидазы F1, эндогликозидазы F2 и эндогликозидазы F4.

11. Способ по п. 10, где PNGаза F представляет собой PNGазу F Rapid.

12. Способ по п. 11, где PNGаза F Rapid является невозстанавливающей.

13. Способ по п. 11 или п. 12, где дегликозилирование меченого образца предусматривает нагревание образца до приблизительно 50°C в течение 10 минут.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где дегликозилирование меченого образца предусматривает формирование реакционной смеси, содержащей 0,2-1,5 мг

терапевтического белка и эндогликозидазы.

15. Способ по любому из пп. 3-8, где меньшей мере один присоединенный гликан является O-связанным гликаном.

16. Способ по п. 15, где

эндогликозидаза катализирует дегликозилирование O-связанных гликанов; и/или эндогликозидаза содержит эндо- α -N-ацетилгалактозаминидазу (O-гликозидазу).

17. Способ по любому из пп. 1-16, где мечение образца флуоресцентной меткой предусматривает нагревание образца до приблизительно 35°C в течение 10-30 минут.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где образец подвергают денатурации с применением восстанавливающего раствора или невосстанавливающего раствора.

19. Способ по п. 18, где

образец подвергают денатурации с применением восстанавливающего раствора и восстанавливающий раствор содержит дитиотреитол (DTT); или

образец подвергают денатурации с применением невосстанавливающего раствора и невосстанавливающий раствор содержит йодацетамид (IAM).

20. Способ по любому из пп. 1-19, где

денатурирование образца предусматривает нагревание образца до температуры от 50°C до 99°C в течение от 1 до 60 минут;

гашение непрореагировавшей флуоресцентной метки предусматривает добавление стоп-раствора; и/или

способ дополнительно включает проведение анализа эталонного стандарта параллельно с дегликозилированным меченым образцом.

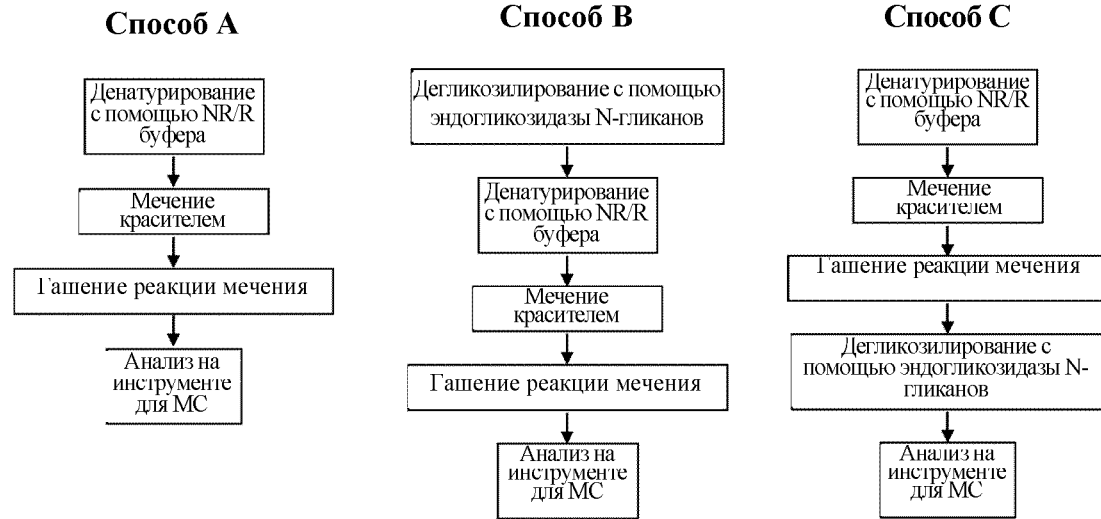
21. Способ по любому из пп. 1-20, где электрофорез выбран из группы, состоящей из гель-электрофореза, изоэлектрического фокусирования, капиллярного электрофореза (CE) или капиллярного электрофореза на микрочипе (MCE).

22. Способ по любому из пп. 1-21, где способ приводит в результате к уменьшению интерференции со свободным красителем в диапазоне менее 20 кДа и уменьшению или устранению пика эндогликозидазы на электрофореграмме по сравнению с электрофореграммой, полученной при использовании образца, меченного после дегликозилирования.

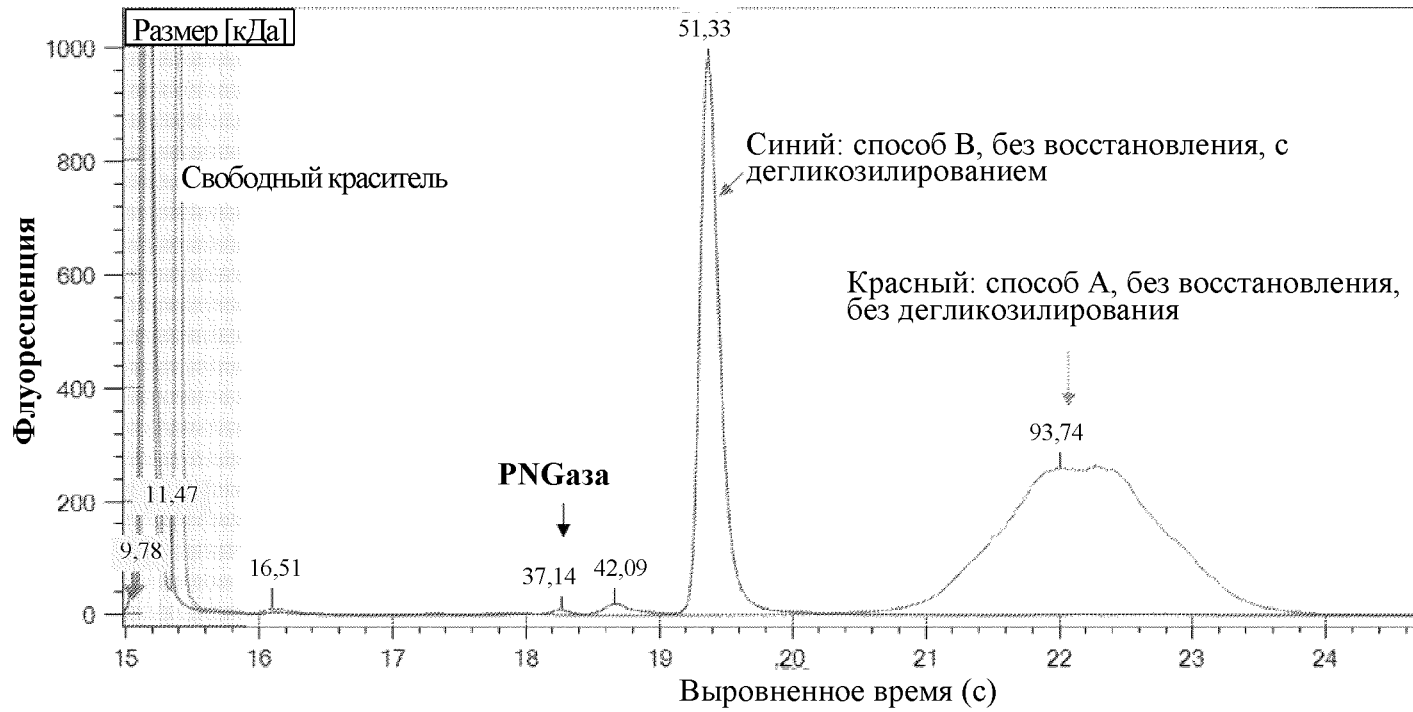
23. Способ по п. 22, где пик эндогликозидазы уменьшается на по меньшей мере 5%, на по меньшей мере 10%, на по меньшей мере 20%, на по меньшей мере 30%, на по меньшей мере 40%, на по меньшей мере 50%, на по меньшей мере 60%, на по меньшей мере 70%, на по меньшей мере 80% или на по меньшей мере 90% по сравнению с электрофореграммой, полученной при использовании образца, меченного после дегликозилирования.

По доверенности

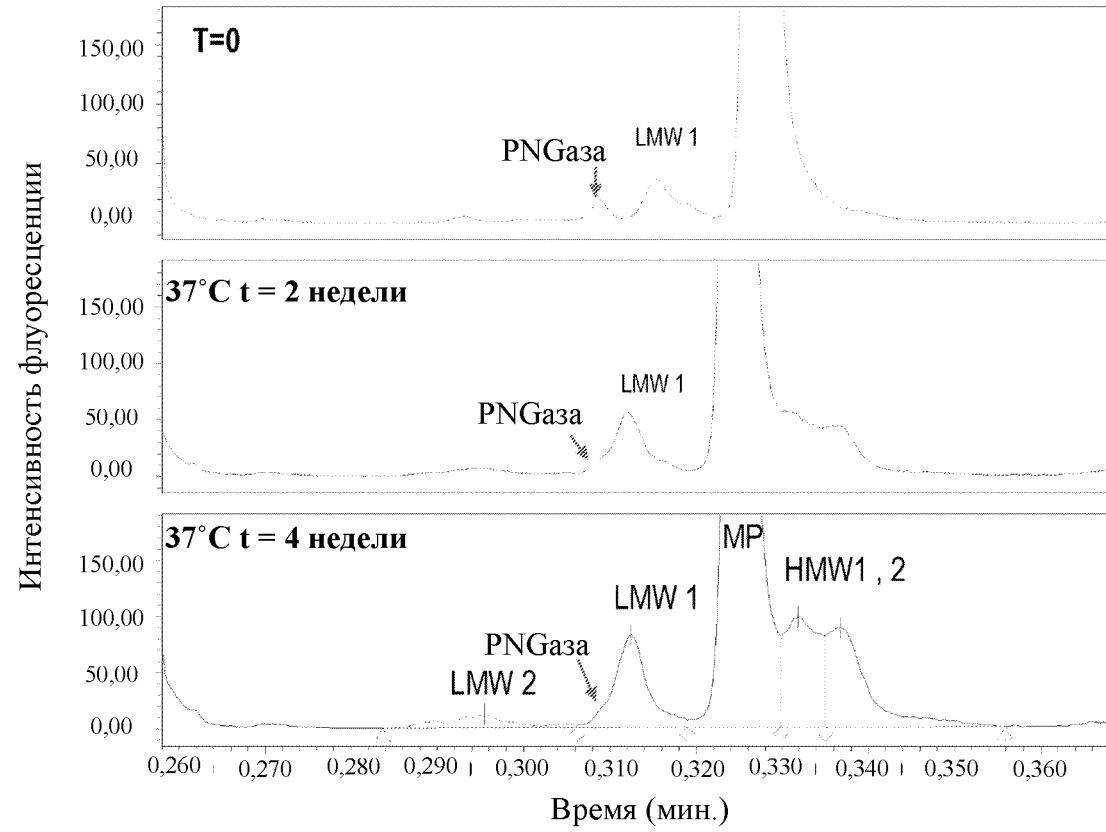
Фиг. 1



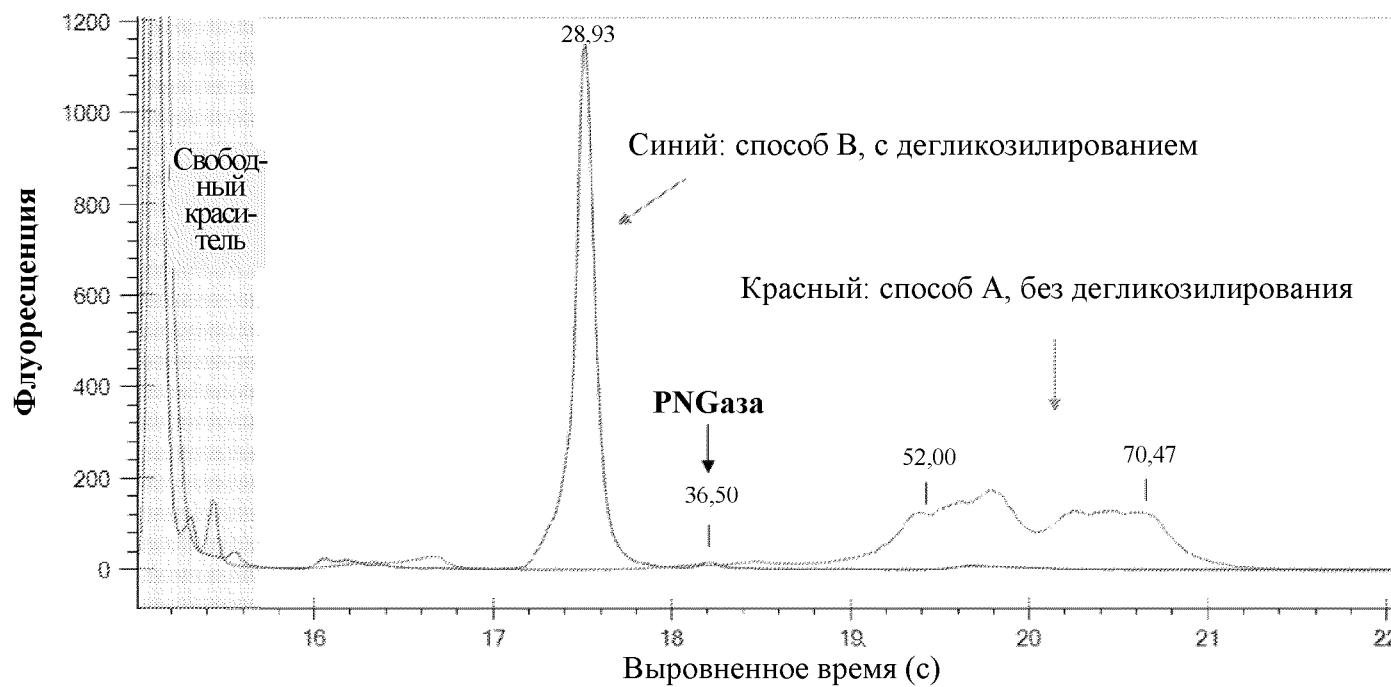
Фиг. 2



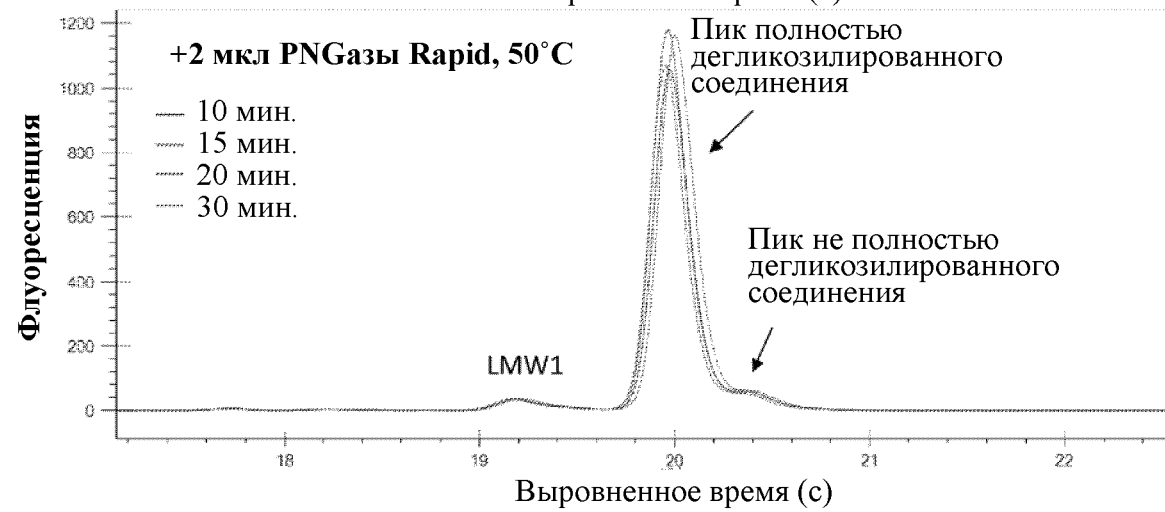
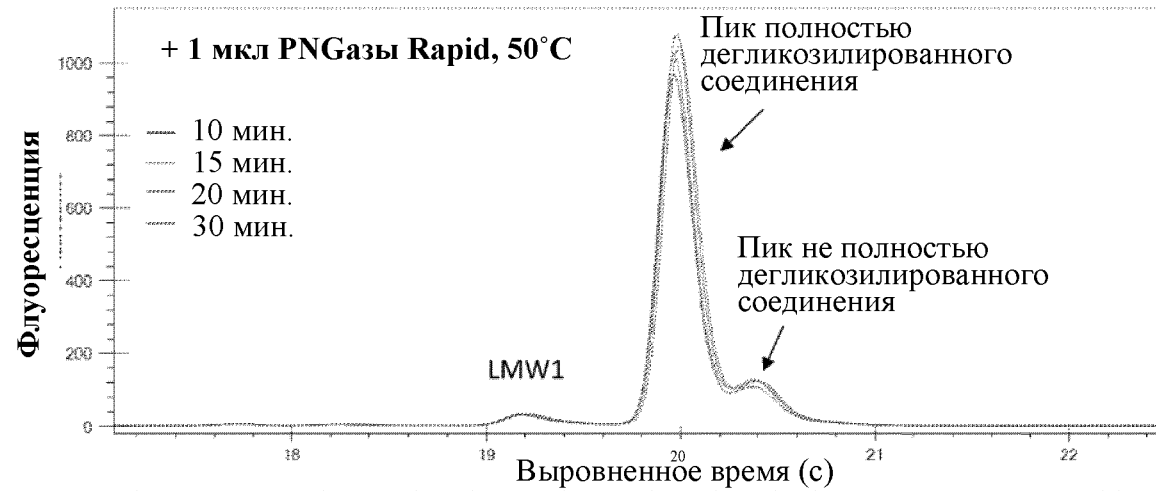
Фиг. 3



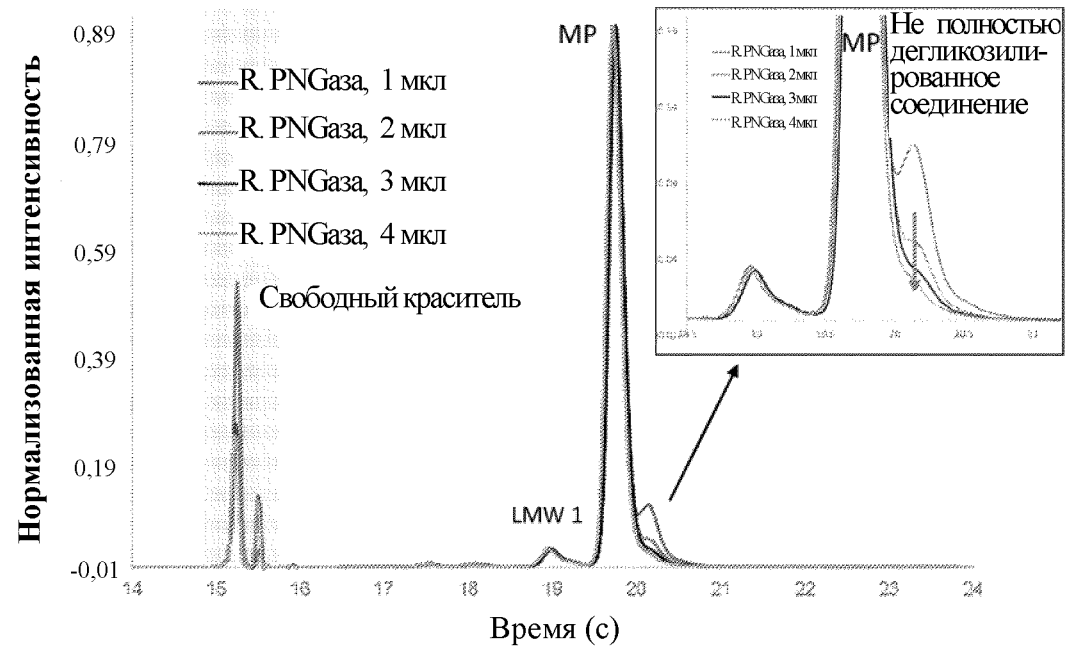
Фиг. 4



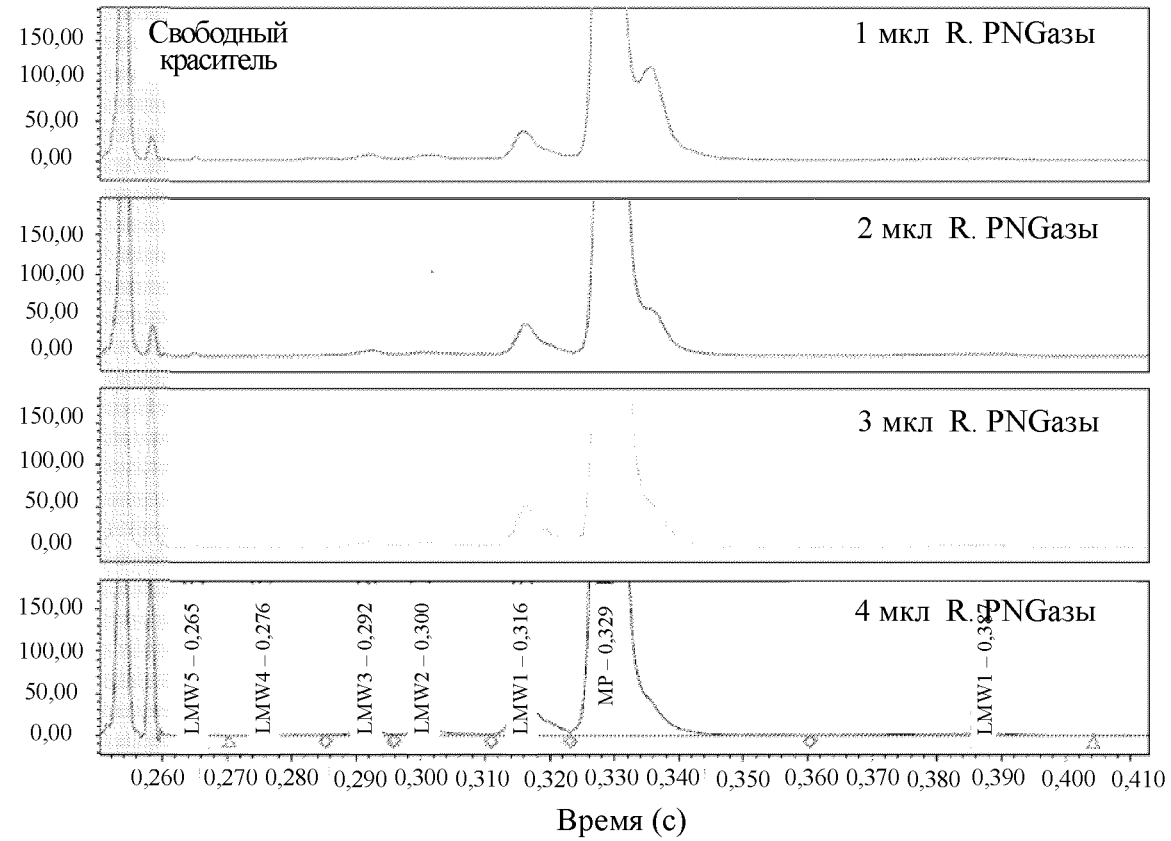
Фиг. 5



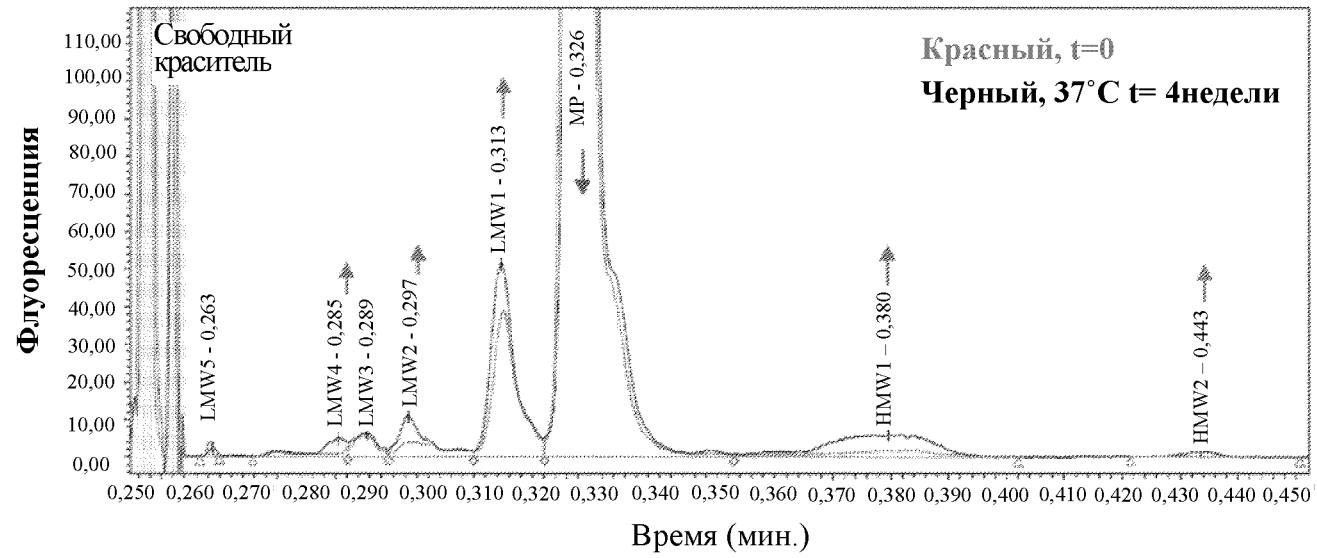
Фиг. 6



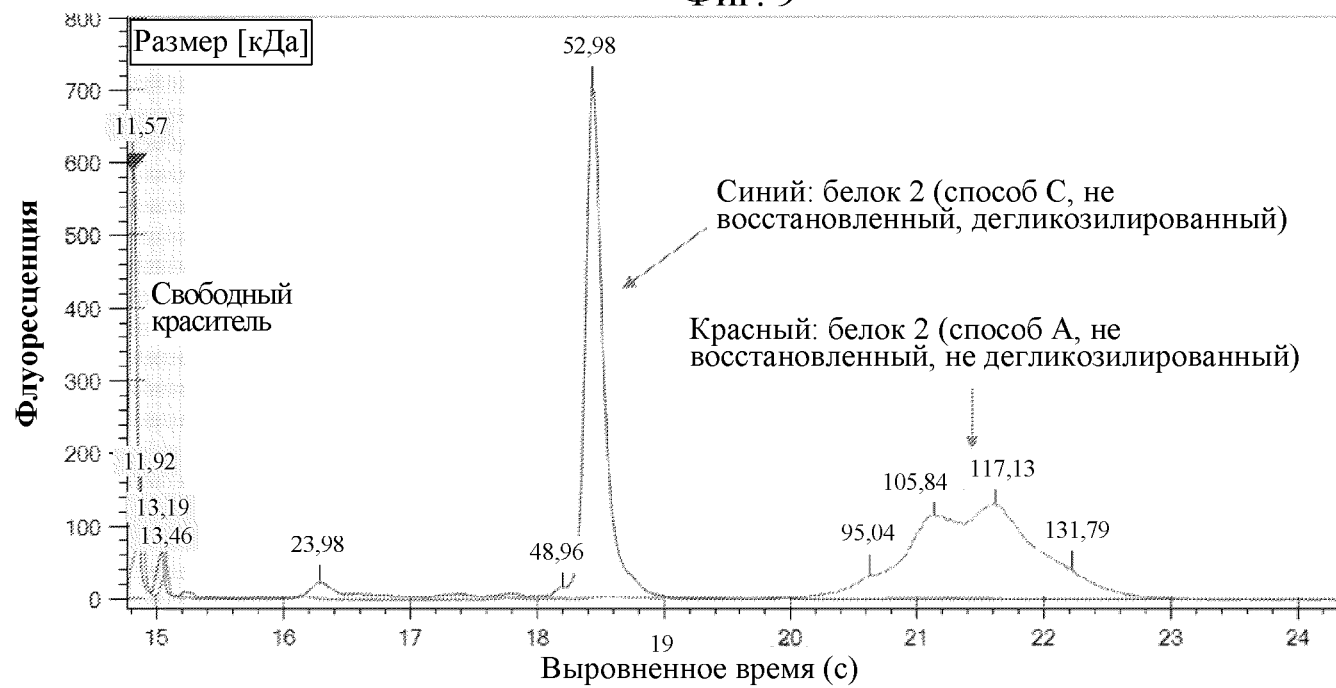
Фиг. 7



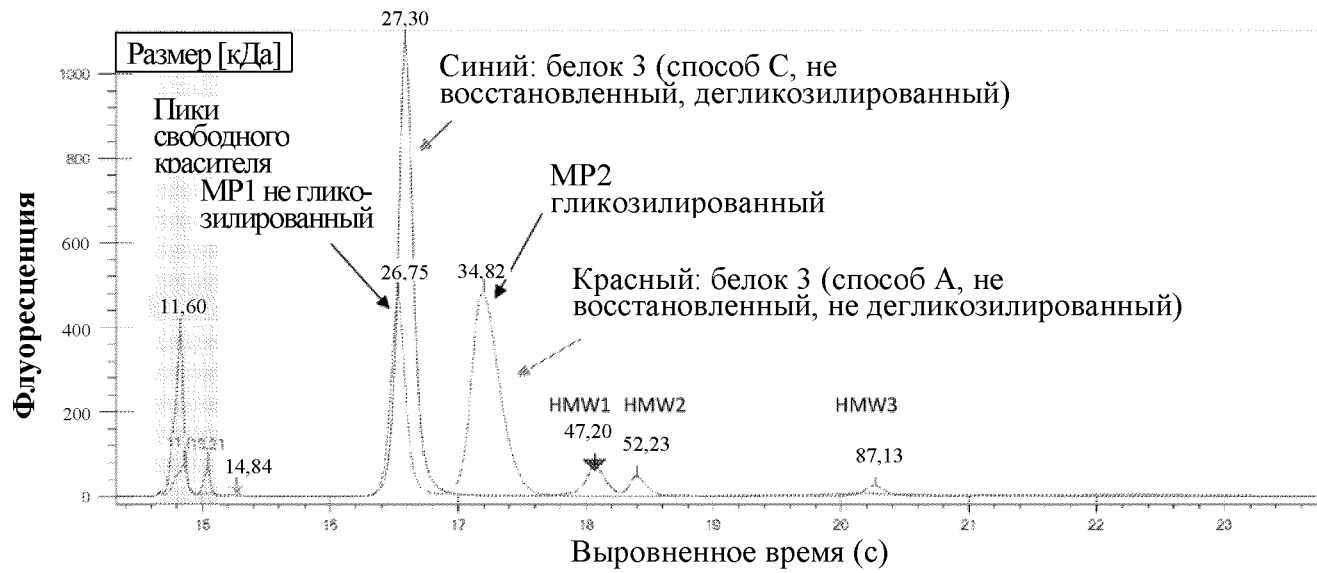
Фиг. 8



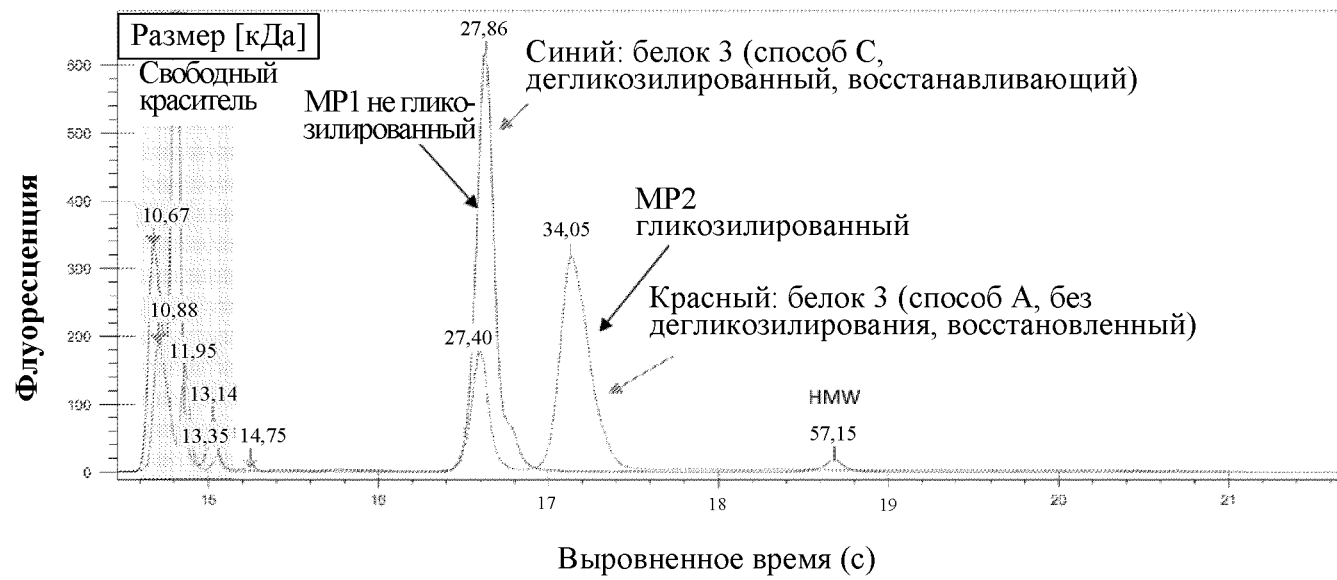
Фиг. 9



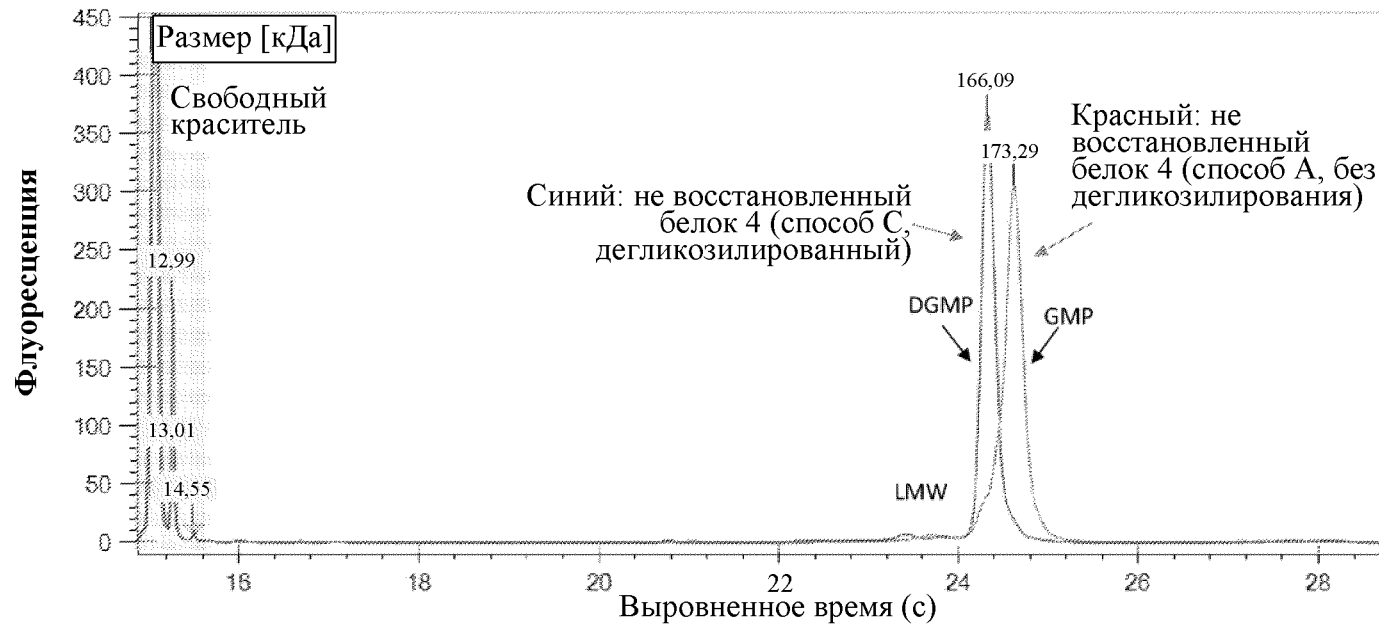
Фиг. 10



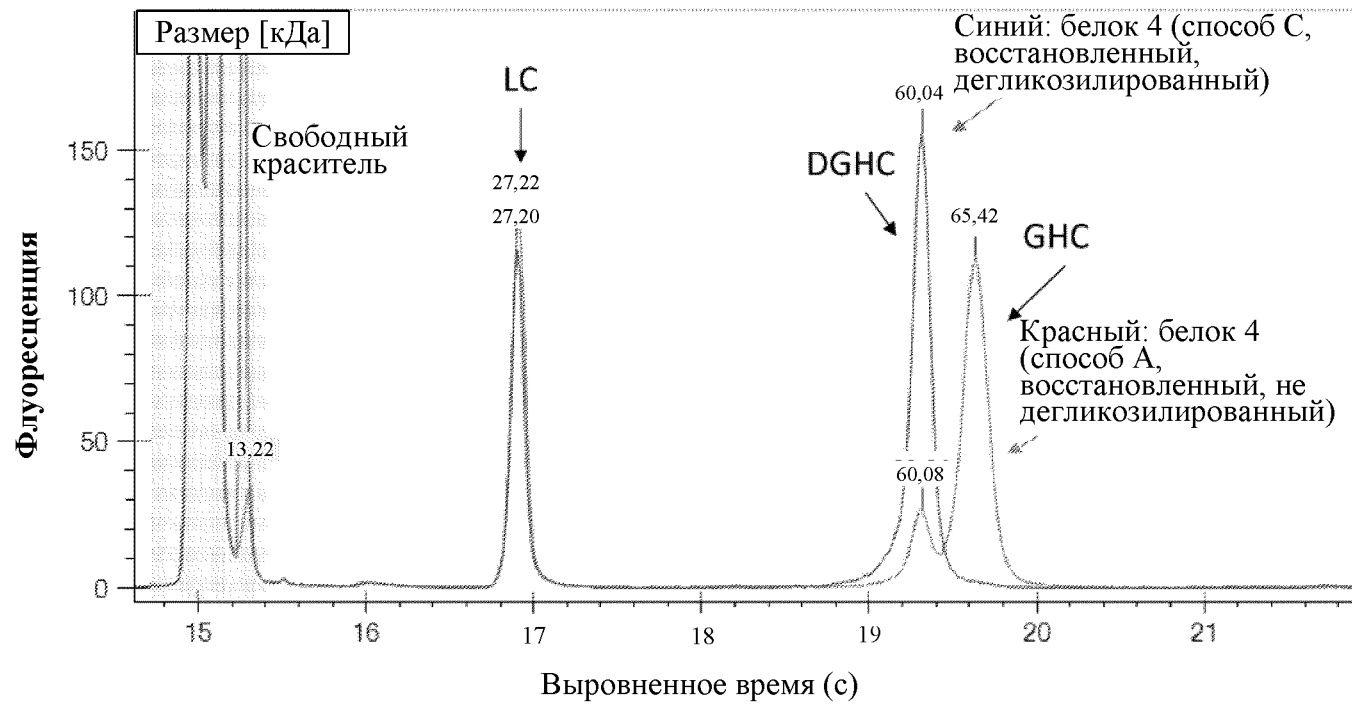
Фиг. 11



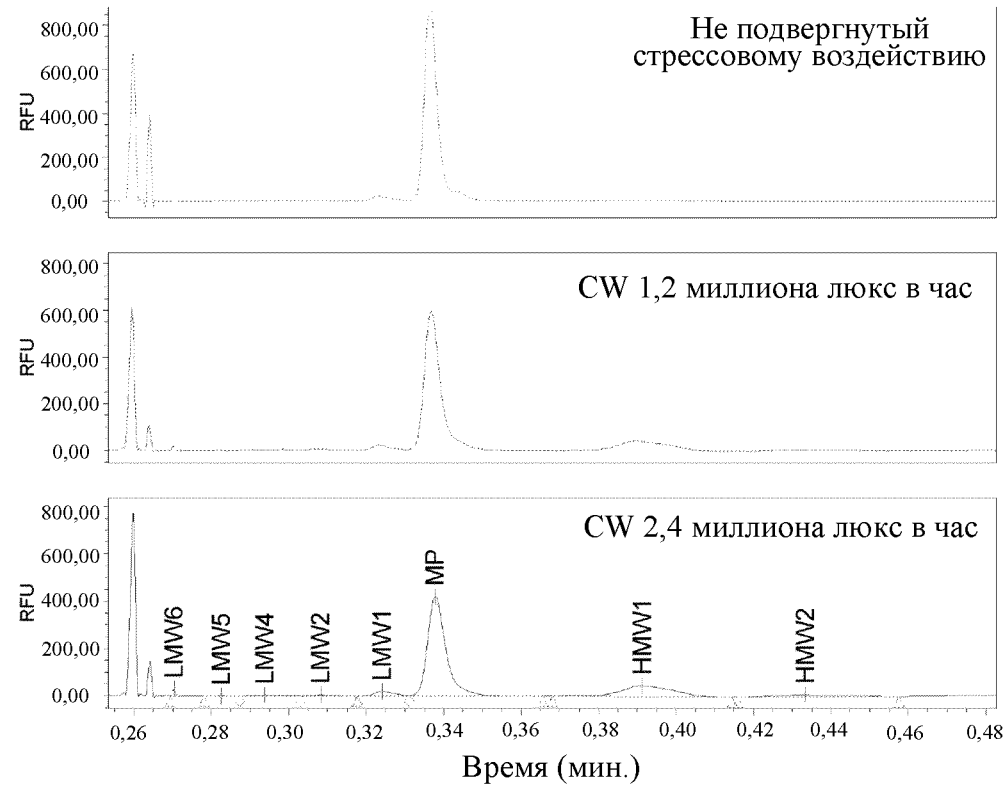
Фиг. 12



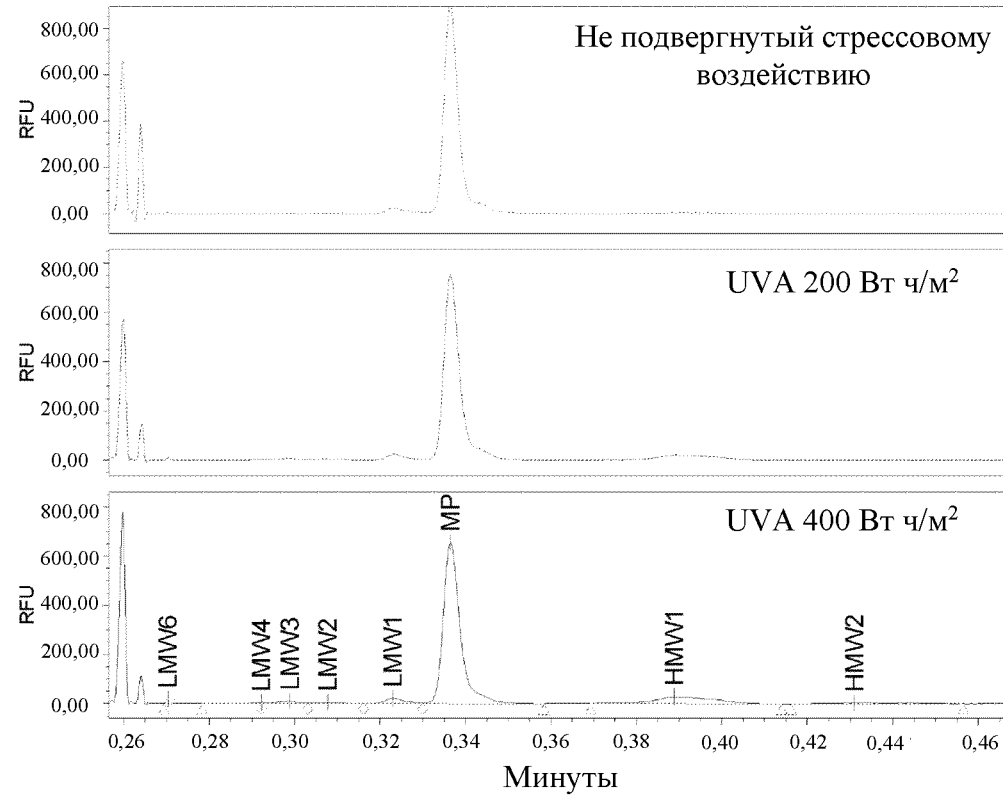
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference REGE-019001WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2021/014111	International filing date (<i>day/month/year</i>) 20 January 2021 (20-01-2021)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 21 January 2020 (21-01-2020)
Applicant REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/014111

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/014111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. G01N33/58 C07K1/26 G01N33/68
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 G01N C07K
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/184325 A2 (NEW ENGLAND BIOLABS INC [US]) 3 December 2015 (2015-12-03) claims 1-29; examples 11,12 -----	1-90
A	WO 2016/069764 A1 (WATERS TECHNOLOGIES CORP [US]) 6 May 2016 (2016-05-06) claims 1-18; examples 2, 4, 5 -----	1-20
A	US 2019/285580 A1 (RIEHLMAN TIMOTHY [US] ET AL) 19 September 2019 (2019-09-19) claims 10-18 -----	1-20

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 21 April 2021

Date of mailing of the international search report
 10/05/2021

Name and mailing address of the ISA/
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer
 Moreno de Vega, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/014111

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015184325 A2	03-12-2015	CN 106604930 A	26-04-2017
		EP 3149034 A2	05-04-2017
		KR 20170012286 A	02-02-2017
		US 2015346194 A1	03-12-2015
		US 2017138959 A1	18-05-2017
		WO 2015184325 A2	03-12-2015

WO 2016069764 A1	06-05-2016	CN 107110785 A	29-08-2017
		DK 3213056 T3	28-09-2020
		EP 3213056 A1	06-09-2017
		EP 3748340 A1	09-12-2020
		JP 2018501465 A	18-01-2018
		US 2018188259 A1	05-07-2018
		WO 2016069764 A1	06-05-2016

US 2019285580 A1	19-09-2019	AU 2019239633 A1	19-11-2020
		BR 112020015291 A2	08-12-2020
		CA 3089655 A1	26-09-2019
		CN 111868085 A	30-10-2020
		EA 202092203 A1	07-12-2020
		EP 3768709 A1	27-01-2021
		KR 20200130821 A	20-11-2020
		SG 11202007011Y A	28-08-2020
		TW 202004178 A	16-01-2020
		US 2019285580 A1	19-09-2019
		WO 2019182901 A1	26-09-2019
