

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090515** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.26

(22) Дата подачи заявки
2018.08.17

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
G01N 27/26 (2006.01)
G01N 27/27 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)

**(54) КАПИЛЛЯРНОЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ С
ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ НЕПОСРЕДСТВЕННО В КАПИЛЛЯРЕ ДЛЯ АНАЛИЗА
ВАРИАНТОВ БЕЛКА В МАТРИЦЕ ОБРАЗЦА**

(31) 62/547,602

(32) 2017.08.18

(33) US

(86) PCT/US2018/046893

(87) WO 2019/036604 2019.02.21

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

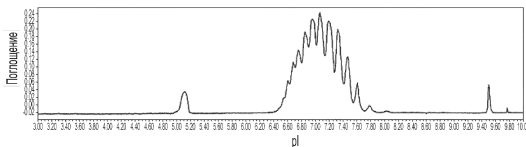
(72) Изобретатель:

**Рамбхадран Ану, Цуй Пенг, Райан
Клэр, Бигварф Пол, Ластро Майкл,
Ма Цзюньюй, Лу Кунь (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Варианты осуществления настоящего раскрытия направлены на способы, системы, устройства и наборы, соответствующие способу анализов отличающихся зарядом вариантов белка, такого как сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF-Trap.



A1

202090515

202090515

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420–560382EA/085

КАПИЛЛЯРНОЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ С ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ НЕПОСРЕДСТВЕННО В КАПИЛЛЯРЕ ДЛЯ АНАЛИЗА ВАРИАНТОВ БЕЛКА В МАТРИЦЕ ОБРАЗЦА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящей заявкой испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США с серийным № 62/547602, поданной 18 августа 2017 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, который был представлен в формате ASCII посредством EFS–Web и включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 15 августа 2018 г., называется REGE–005_001WO_ST25.txt и имеет размер 4214 байта.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Область применения настоящего раскрытия охватывает способы и системы для анализа вариантов заряда белков, таких как VEGF Trap, в матрице образца.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Анализ отличающихся зарядом вариантов часто является желательным для различных белков, используемых в качестве биофармацевтических препаратов, поскольку такие изменения могут влиять на активность, стабильность и в некоторых случаях безопасность пациента. Обычные способы, используемые в промышленности для идентификации и характеристики отличающихся зарядом вариантов, включают ионообменную хроматографию, гель–электрофорез с изоэлектрическим фокусированием и капиллярное изоэлектрическое фокусирование. Капиллярное изоэлектрическое фокусирование с детектированием непосредственно в капилляре было признано применимым ввиду его высокой разрешающей способности, уменьшенного объема выборки и быстрого времени выполнения. Соответственно, способы и системы, использующие капиллярное изоэлектрическое фокусирование с детектированием непосредственно в капилляре для определения отличающихся зарядом вариантов для таких белков, как VEGF Trap, были бы полезными.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем документе описаны способы и системы для анализа отличающихся зарядом вариантов различных белков. Например, способы и системы могут быть применимыми для анализа отличающихся зарядом вариантов VEGF Trap. Вместо того, чтобы предоставлять результаты о распределении отличающихся зарядом вариантов путем группирования полос 3–9 в изоэлектрическом фокусирующем геле, что является одобренным в настоящее время способом анализа VEGF Trap, способы и системы, описанные в настоящей документе, обычно используют капиллярное

изоэлектрическое фокусирование с детектированием непосредственно в капилляре, чтобы дать заключение о гетерогенности заряда в процентах изоформ отличающихся зарядом вариантов, и группируют их в три различные области электрофореграммы. Этот подход к выдаче результатов может быть более чувствительным к изменениям, которые наблюдают в изоформах образцов VEGF Trap.

[0006] Как указано выше, варианты осуществления настоящего раскрытия направлены на способы, системы и устройства для определения отличающихся зарядом вариантов белка, и, в частности, анализ с помощью капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре (iCIEF) для оценки дисперсии заряда таких белков, как ингибитор сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), именуемый в дальнейшем «VEGF–Trap». iCIEF является альтернативой одобренному в настоящее время методу на основе изоэлектрического фокусирования (IEF) для анализа отличающихся зарядом вариантов VEGF–Trap.

[0007] Варианты осуществления iCIEF соответствуют методикам, которые разделяют отличающиеся зарядом варианты белка на основе их изоэлектрической точки (pI). Например, в некоторых вариантах осуществления образец белка загружают в разделительный капилляр, содержащий смесь амфолита–носителя (например, Pharmalyte™), метилцеллюлозы и стабилизирующей добавки (т.е. мочевины). Напряжение подают в течение заранее определенного периода времени, в результате чего амфолит–носитель образует градиент pH в пределах капилляра. В некоторых вариантах осуществления напряжение подают в течение второго, более продолжительного периода времени, соответствующего времени «фокусирования». Это приводит к тому, что отличающиеся зарядом варианты белка мигрируют в пределах капилляра вплоть до достижения точки, в которой общий заряд вариантов является нейтральным (т.е., их pI).

[0008] В подобных вариантах осуществления капилляр (который покрывают фторуглеродом (FC)) соединен с цифровой (например, CCD) камерой, которая делает возможным прямое детектирование и количественное определение отличающихся зарядом вариантов белка. В частности, после времени фокусирования CCD камера настроена на изображение капилляра (предпочтительно в режиме реального времени) для детектирования белка в пределах капилляра. Детектирование, в некоторых вариантах осуществления происходит при длине волны приблизительно 280 нм. Параметры этой методики включают:

- марку и концентрацию амфолита,
- тип и концентрацию применяемых добавок и
- время фокусирования и концентрацию образца.

[0009] Агрегация и осаждение белка в пределах капилляра наносит ущерб воспроизводимости электрофореграммы. С этой целью могут использоваться добавки, такие как мочевина, чтобы помочь стабилизировать и сольюбилизировать белок, поскольку он находится в фокусе.

[0010] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления предлагается способ

анализирования отличающихся зарядом вариантов сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF–Trap, и этот способ включает загрузку образца белка в разделительный капилляр, который имеет смесь, по меньшей мере, амфолита–носителя, метилцеллюлозы и стабилизирующей добавки, прикладывание первого напряжения в течение первого заранее определенного периода времени, такого, что амфолит–носитель образует градиент рН в пределах капилляра, прикладывание второго напряжения в течение второго заранее определенного периода времени для фокусирования миграции отличающихся зарядом вариантов белка к их соответствующей рI и детектирование, и количественное определение отличающихся зарядом вариантов белка.

[0011] В подобных вариантах осуществления детектирование и количественное определение отличающихся зарядом вариантов включает измерение поглощения множества изоформ отличающихся зарядом вариантов, разделение множества изоформ отличающихся зарядом вариантов на изолированные области, включающие, по меньшей мере, первую кислую/кислотную область (R1), вторую нейтральную область (R2) и третью основную/щелочную область (R3), и определение процента изоформ отличающихся зарядом вариантов, попадающих в пределы каждой из областей R1, R2 и R3.

[0012] Для подобных вариантов осуществления анализ изображения для детектирования и количественного определения может быть выполнен в соответствии с традиционными способами и системами (например, программное обеспечение для анализа изображений).

[0013] В приведенных выше вариантах осуществления может быть включен любой из следующих дополнительных признаков/функциональных возможностей (приводя к дополнительным патентоспособным вариантам осуществления), однако, следует отметить, что любой один или более из этих признаков может отличаться и все же находиться в пределах объема настоящего изобретения – приведенный ниже список представляет собой лишь один вариант осуществления:

- осуществляют детектирование и количественное определение отличающихся зарядом вариантов;
- детектирование отличающихся зарядом вариантов происходит при длине волны приблизительно 280 нм;
- концентрация белка, загруженного в капилляр, составляет приблизительно 2,0 мг/мл;
- стабилизирующая добавка содержит мочевины;
- количество мочевины в смеси составляет приблизительно 2М;
- смесь содержит приблизительно 0,35% метилцеллюлозы;
- первое напряжение составляет 1500 В;
- первое заранее определенное время составляет приблизительно 1 минуту;
- второе напряжение составляет 3000 В;
- второе заранее определенное время составляет приблизительно 7 минут;
- концентрация белка, загруженного в капилляр, составляет приблизительно от 1,0

до 8,0 мг/мл;

- количество мочевины в смеси составляет более 0 М и менее приблизительно 8 М;
- смесь включает от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,35% метилцеллюлозы или находится в любом промежуточном интервале;
- первое напряжение составляет от приблизительно 1 В до около 3000 В или находится в любом промежуточном интервале;
- первое заранее определенное время составляет от приблизительно 1 секунды до приблизительно 5 минут или находится в любом промежуточном интервале;
- второе напряжение составляет от около 1 В до приблизительно 3000 В или находится в любом промежуточном интервале; и/или
- второе заранее определенное время составляет от приблизительно 1 минуты до приблизительно 14 минут или находится в любом промежуточном интервале.

[0014] В некоторых вариантах осуществления предлагается капилляр iCIEF, сконфигурированный для применения в анализе отличающихся зарядом вариантов VEGF-Trap, и он включает капилляр, сконфигурированный для получения белка, и сконфигурированный со смесью амфолита-носителя, метилцеллюлозы и стабилизирующей добавки. Капилляр также может содержать фторуглеродное покрытие.

[0015] В некоторых вариантах осуществления предлагается набор iCIEF, сконфигурированный для применения в анализе отличающихся зарядом вариантов VEGF-Trap, и он содержит один или более капилляров, сконфигурированных для получения белка и сконфигурированных со смесью амфолита-носителя, метилцеллюлозы и стабилизирующей добавки, причем капилляр содержит фторуглеродное покрытие.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0016] Фигуры 1A–1F изображают электрофореграммы VEGF Trap с использованием разных амфолитов. На Фигуре 1A, амфолит представляет собой Pharmalyte™, имеющий pI, которая находится в диапазоне 3–10; на Фигуре 1B амфолит представляет собой комбинацию Pharmalyte™ с pI, которая находится в диапазоне 5–8, и Pharmalyte™, имеющий pI, которая находится в диапазоне 8–10,5; на Фигуре 1C амфолит представляет собой Servalyt™, имеющий pI, которая находится в диапазоне 2–9; на Фигуре 1D амфолит представляет собой Servalyt™, имеющий pI, которая находится в диапазоне 4–9; на Фигуре 1E амфолит представляет собой Biolyte™, имеющий pI, которая находится в диапазоне 3–10; и на Фигуре 1F амфолит представляет собой комбинацию Pharmalyte™, имеющего pI, которая находится в диапазоне 3–10, и Pharmalyte™, имеющего pI, которая находится в диапазоне 6,7–7.

[0017] На Фигуре 2A–2E показано сравнение электрофореграмм VEGF Trap при различных концентрациях мочевины.

[0018] На Фигуре 3 показано сравнение электрофореграммы VEGF Trap, полученной с применением способов изоэлектрического фокусирования и капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре.

[0019] Фигуры 4A–4G иллюстрируют анализ фракции OFFGEL VEGF Trap

(фракции №5–№10) с применением способов изоэлектрического фокусирования и капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре.

[0020] Фигуры 5A–5F иллюстрируют электрофореграммы RS VEGF Trap с фракциями OFFGEL VEGF Trap в качестве внутреннего стандарта (фракции №5–№10), проанализированные на Фиг. 4A–4G.

[0021] На Фигуре 6 показано сравнение электрофореграммы холостой пробы и VEGF Trap с независимым маркером в качестве внутреннего стандарта.

[0022] Фигура 7A иллюстрирует электрофореграмму капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре образца RS VEGF Trap с обозначенными областями 1, 2 и 3.

[0023] Фигура 7B иллюстрирует различие в выдаче результатов электрофореграммы между способом изоэлектрического фокусирования и способом капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре.

[0024] Фигура 8 представляет данные, полученные с применением капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре, по сравнению со стабильностью VEGF Trap.

[0025] Фигура 9 представляет данные стабильности, полученные с применением капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре, осуществляемого на подвергавшихся принудительному разложению образцах VEGF Trap.

[0026] Фигуры 10A–10C иллюстрируют статистический анализ данных капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре, предлагаемых на Фигуре 9.

[0027] Фигура 11 представляет данные, относящиеся к линейности способа капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре.

[0028] На Фигуре 12 показано сравнение электрофореграмм капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре трех образцов амфолита.

[0029] Фигуры 13A–13D иллюстрируют статистический анализ данных капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре, полученных из исторических образцов VEGF Trap.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0030] В настоящем документе описаны способы и системы для анализа отличающихся зарядом вариантов различных белков, например, VEGF Trap. VEGF Trap представляет собой слитый белок, содержащий последовательность, показанную в Таблице 1. Вместо того, чтобы выдавать результат о распределении отличающихся зарядом вариантов путем группирования полос 3–9 в изоэлектрическом фокусирующем

геле, что является одобренным в настоящее время способом анализа VEGF Trap, в способах и системах, описанных в настоящем документе, обычно используют капиллярное изоэлектрическое фокусирование с детектированием непосредственно в капилляре, чтобы измерить гетерогенность заряда в процентах изоформ отличающихся зарядом вариантов, и группировать их в три различные области электрофореграммы. Этот подход к выдаче результатов может быть более чувствительным к изменениям, которые наблюдают в изоформах образцов VEGF Trap, как упоминалось ранее.

Таблица 1 – Последовательность VEGF Trap

Белок	Последовательность	SEQ ID NO
VEGF Trap	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLK KFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVN GHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLC TARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEM KKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRV HEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	1

[0031] Следующие аббревиатуры используются по всему настоящему раскрытию:

- iCIEF – капиллярное изоэлектрическое фокусирование с детектированием непосредственно в капилляре
- IEF – изоэлектрическое фокусирование
- pI – изоэлектрическая точка
- RS – стандартный образец
- DS – лекарственная субстанция
- DSI – интермедиат лекарственной субстанции
- FDS – лекарственная субстанция в сформированной смеси.

[0032] Способы анализа отличающихся зарядом вариантов VEGF Trap обычно включают загрузку образца белка в разделительный капилляр, который содержит смесь, по меньшей мере, амфолита–носителя, метилцеллюлозы и стабилизирующей добавки, прикладывание первого напряжения в течение первого заранее определенного периода времени, такого, что амфолит–носитель образует градиент pH в пределах капилляра, прикладывание второго напряжения в течение второго заранее определенного периода времени для фокусирования миграции отличающихся зарядом вариантов белка в пределах капилляра, такого, что общий заряд вариантов является нейтральным, и

детектирование и количественное определение отличающихся зарядом вариантов белка.

[0033] В разделительный капилляр может быть загружен VEGF Trap в концентрации, которая находится в диапазоне от около 0,5 мг/мл до около 2 мг/мл. Например, в разделительный капилляр может быть загружен VEGF Trap в концентрации около 0,5 мг/мл, около 1,0 мг/мл, около 1,5 мг/мл или около 2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления в разделительный капилляр загружают VEGF Trap в концентрации около 1,0 мг/мл.

[0034] Количество метилцеллюлозы в смеси может находиться в диапазоне от около 0,01% до около 0,35%. Например, количество метилцеллюлозы в смеси может составлять около 0,01%, около 0,05%, около 0,10%, около 0,15%, около 0,20%, около 0,25%, около 0,30% или около 0,35%. В некоторых вариантах осуществления количество метилцеллюлозы в смеси составляет около 0,35%.

[0035] Что касается первого напряжения, оно может находиться в диапазоне от приблизительно 1 В до приблизительно 3000 В. Например, первое напряжение может составлять около 1 В, около 100 В, около 500 В, около 1000 В, около 1500 В, около 2000 В, около 2500 В или около 3000 В. В некоторых вариантах осуществления первое напряжение составляет около 1500 В.

[0036] Второе напряжение также может находиться в диапазоне от приблизительно 1 В до около 3000 В. Например, второе напряжение может составлять около 1 В, около 100 В, около 500 В, около 1000 В, около 1500 В, около 2000 В, около 2500 В или около 3000 В. В некоторых вариантах осуществления второе напряжение составляет около 3000 В.

[0037] Первое заранее определенное время может находиться в диапазоне от около 1 секунды до около 5 минут. Например, первое заранее определенное время может составлять около 1 секунды, около 10 секунд, около 20 секунд, около 30 секунд, около 40 секунд, около 50 секунд, около 1 минуты (60 секунд), около 1,5 минуты (90 секунд), около 2 минут (120 секунд), около 2,5 минуты (150 секунд), около 3 минут (180 секунд), около 3,5 минуты (210 секунд), около 4 минут (240 секунд), около 4,5 минуты (270 секунд) или около 5 минут (300 секунд). В некоторых вариантах осуществления первое заранее определенное время составляет около 1 минуты (60 секунд).

[0038] Второе заранее определенное время может находиться в диапазоне от около 1 минуты до около 14 минут. Например, второе заранее определенное время может составлять около 1 минуты, около 2 минут, около 3 минут, около 4 минут, около 5 минут, около 6 минут, около 7 минут, около 8 минут, около 9 минут, около 10 минут, около 11 минут, около 12 минут, около 13 минут или около 14 минут. В некоторых вариантах осуществления второе заранее определенное время составляет около 7 минут.

[0039] В смеси может быть использована любая подходящая добавка. В некоторых вариантах осуществления в качестве добавки может быть выгодным использование мочевины. Например, может быть выгодным включать в смесь 2 М мочевины. В смесь также можно включать различные реагенты (амфолиты), как более подробно описано

ниже. В одном варианте осуществления VEGF Trap загружают в капилляр в концентрации 1,0 мг/мл и анализируют с применением способа капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре, который использует смесь 0,35% метилцеллюлозы, 2 М мочевины и 3% амфолита, которая имеет pI 3–10.

[0040] **Реагенты и оборудование.** Таблица 2 ниже приводит реагенты (амфолиты) и оборудование, применяемое в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия. В приведенных примерах используется анализатор отличающихся зарядом вариантов iCE3 (ProteinSimple®). Если не указано иное, при разработке и характеристике способа в качестве исследуемого препарата использовали стандартный образец VEGF–Trap (RSVITV–5).

Таблица 2 – Пример реагентов и других применяемых компонентов

Образец Реагент
Pharmalyte™ 3–10
Servalyt™ 4–9
Servalyt™ 2–9
Pharmalyte™ 5–8
Pharmalyte™ 8–10,5
Pharmalyte™ 6,7–7,7
Biolyte™ 3–10, 40%
Мочевина
Метилцеллюлоза
Маркер pI (5,12, 7,05, 7,65)
iCE3 ProteinSimple®

Пример, по меньшей мере, некоторых вариантов осуществления:

[0041] Скрининг амфолита первоначально осуществляют на основе диапазона pI и источника амфолитов. Четыре амфолита, каждый из которых охватывает уникальный диапазон pI, закупают из трех разных источников. Амфолиты анализируют с использованием следующих исходных данных:

- концентрация белка 2,0 мг/мл,
- 2 М мочевина,
- 0,35% метилцеллюлозы,
- 1 минута предварительного фокусирования при 1500 В и
- 7 минут фокусирования при 3000 В.

[0042] Фигуры 1A–F иллюстрируют электроферограмму, полученную с применением шести диапазонов амфолитов с анализатором заряда iCE3. Используют следующие диапазоны амфолитов:

Фигура А – Pharmalyte 3–10 Фигура В – комбинированный Pharmalyte 5–8/8–10,5
 Фигура С – Servalyt 2–9 Фигура D – Servalyt 4–9

Фигура E – Bio–Lyte 3–10, 40% Фигура F – 3–Blend 3–10 и Pharmalyte 6,7–7,7

[0043] **Выбранный белок.** Амфолиты, которые находятся в диапазоне pI 3–10, выбирают в качестве общего профиля электроферогаммы iCIEF, так как они наиболее близко напоминают электроферогамму из одобренной в настоящее время процедуры анализа отличающихся зарядом вариантов VEGF–Trap (смотри, например, изображение IEF показано на Фигуре 3).

[0044] **Оптимизация мочевины.** Оптимизация способа, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, также включает изменение концентрации мочевины (от отсутствия мочевины до 8 М). Фигуры 2A–2E иллюстрируют влияние подобного изменения концентрации мочевины на электроферогамме образца RSVITV–5 VEGF–Trap. Хотя снижение концентрации мочевины обычно улучшает разрешающую способность, было обнаружено, что увеличенный уровень мочевины (8М) приводит к снижению разрешающей способности. Однако, VEGF–Trap, повторно растворенный при естественных условиях (без мочевины), имел схожие проблемы со сниженной разрешающей способностью и недостаточной воспроизводимостью. Соответственно, общий паттерн пиков и разрешающая способность были сопоставимы друг с другом для VEGF–Trap при выделении с применением концентрации мочевины 1–3 М.

[0045] Дополнительные эксперименты проводили с применением 2 М мочевины для оптимизации концентрации амфолита 3–10 и концентрации белка. Фигура 3 иллюстрирует электроферогаммы, полученные с применением 2 М мочевины, 0,35% метилцеллюлозы и 3% амфолита 3–10 при концентрации белка 1,0 мг/мл. Электроферогамму iCIEF сравнивали с другой электроферогаммой и делали предварительное обозначение пиков (Фигура 3).

[0046] **Характеристика метода.** Профиль общего заряда и паттерн пиков, полученных с применением метода анализа iCIEF, были сопоставимы с профилем полосы IEF (как показано на Фигурах 2A–2E). Тем не менее, чтобы дополнительно понять и сопоставить паттерн полос метода анализа IEF с паттерном пиков, полученных с применением анализа iCIEF, было проведено фракционирование OFFGEL образца VEGF–Trap. Фракции отдельных отличающихся зарядом вариантов, полученных из электрофореза OFFGEL, анализируют с применением методов анализа IEF и iCIEF. Для фракционирования стандартного образца VEGF–Trap с его изоэлектрическими точками, применяют фракционатор Agilent 3100 OFFGEL, а отдельные изоформы, извлеченные в виде жидких фракций, анализируют с применением двух способов, IEF и iCIEF. RS VEGF–Trap фракционируют с использованием полосок с фиксированным градиентом pH (полоски IPG) с pH 6–9, который покрывает диапазон pI отличающихся зарядом вариантов, наблюдаемых для VEGF–Trap. Подробная схема эксперимента и разделения выглядит следующим образом:

[0047] 1) исходный раствор получают путем объединения 2,3 мл 50% глицерина, 230,4 мкл буфера IPG (pH 6–11) и 16,64 мл воды для получения общего объема 19,2 мл.

[0048] 2) раствор VEGF Trap получают путем добавления 73 мкг VEGF (4,2 мг) к

12 мл исходного раствора и 3 мл воды.

[0049] 3) раствор для регидратации полоски IPG получают в избытке путем объединения 1,15 мл воды с 4,6 мл исходного раствора.

[0050] 4) гелевые полоски IPG, диапазон pH 6–9 (24 см), располагают на каждой другой дорожке двух инструментальных лотков и 24 рамки лунок фиксируют над ними. Для регидратации полос, загрузки антител, загрузки лотков на инструмент применяют стандартный протокол набора OFFGEL (смотри, руководство пользователя OFFGEL: Agilent 3100 OFF GEL Fractionator Kit quick Start Guide, 5th Edition Sep 2010).

[0051] 5) применяют температуру платформы 20°C. Стандартный инструментальный способ фокусирования белка для установки на 24 лунки проводился с использованием постоянного тока 50 мкА с настройкой максимального напряжения 8000 В и настройкой максимальной мощности 200 мВт.

[0052] 6) спустя 34 ч фракционирования, прогон останавливают и подобные номера лунок с каждой дорожки для лунок с 3 по 12, объединяют, после чего заменяют водой и концентрируют перед анализом приблизительно в 5 раз.

[0053] 7) количества антител в каждой фракции определяют путем измерения поглощения на Nanodrop при 280 нм с коэффициентом экстинкции 1,15. Один из инструментов определения концентрации фракции, а затем умножение объема фракции на концентрацию.

[0054] Вкратце, 4,2 мг RS VEGF–Trap фракционируют с применением 12 полосок IPG в течение 32 часов; отдельные фракции из каждой полоски, соответствующие тому же самому диапазону pI, объединяют и количественно определяют после диализа. После фракционирования в общей сложности анализируют семь фракций (фракции 4–10), которые имели достаточное восстановление, с использованием IEF и iCIEF. Фракции анализируют двумя путями: Отдельный анализ фракций OFFGEL (4–10) с применением методов анализа IEF и iCIEF (смотри Фигуру 4) и с добавлением в качестве внутреннего стандарта фракций OFFGEL (5–10) в RS VEGF–Trap с последующим анализом образцов с внутренним стандартом с применением IEF и iCIEF (Фигура 5). Таблица 3 приводит фракции и соответствующее количество, полученное в исследовании фракционирования OFFGEL.

Таблица 3

Фракция OFFGEL №	Конц. белка (мг/мл)	Полученный объем (мкл)
3*	1,229	15
4	1,628	98
5	1,884	104
6	2,909	113
7	3,498	124
8	3,56	124
9	3,326	124

Фракция OFFGEL №	Конц. белка (мг/мл)	Полученный объем (мкл)
10	2,098	110
11*	1,235	94
12*	2,574	15

[0055] В дополнение к анализу фракций OFFGEL независимо с применением IEF и iCIEF, фракции (5–10), которые дали более высокое восстановление, имели внутренний стандарт с соотношением 1:0,1 (RS VEGF–Trap : фракция) и их анализируют с помощью двух способов анализа отличающихся зарядом вариантов. Фигура 5 иллюстрирует панель электрофореграмм с RS VEGF–Trap в качестве внутреннего стандарта с фракциями OFFGEL (5–10) VEGF–Trap, которые анализируют с применением методов анализа iCIEF (верхняя панель) и IEF (нижняя панель). Для каждой из фракций OFFGEL в качестве внутреннего стандарта в RS, соответствующий контрольный RS (без внутреннего стандарта) накладывают на методы анализа IEF и iCIEF. Перекрытие образцов с внутренним стандартом и без внутреннего стандарта (RS+OFFGEL и RS) помогает в визуализации и понимании корреляции паттернов пиков между методами анализа IEF и iCIEF. В каждой панели усиление видов зарядов, соответствующих фракции с внутренним стандартом, выделено стрелкой, начинающейся от кислых фракций (Фигура 5A) до основных фракций (Фигура 5F).

[0056] Корреляция между паттерном полосы IEF на основе геля и паттерном пика iCIEF на основе капилляра была очевидна из анализа фракций OFFGEL. Из Фигур 4 и 5 (анализ отдельных фракций вместе с фракциями с внутренним стандартом) можно сделать вывод, что разделение изоформ заряда, которое достигают с помощью одобренного в настоящее время метода на основе геля IEF, является сравнимым и схожим с паттерном пиков, полученным с применением способа на основе капилляра iCIEF для VEGF–Trap.

[0057] **Выдача результатов о распределении отличающихся зарядом вариантов с применением метода iCIEF.** Одобренный в настоящее время метод IEF для распределения отличающихся зарядом вариантов VEGF–Trap указывает на процент дисперсии заряда путем группирования полос 3–9 в геле IEF. Проценты площади полос 3–9 обобщаются и приводятся с использованием, например, миоглобина (независимого маркера белка) в качестве руководства для определения числа полос на основе pI миоглобина. Критерий приемлемости в соответствии с действующими техническими требованиями (SPEC) для метода IEF составляет 82% (полосы 3–9).

[0058] Аналогичный подход был принят для нового метода анализа iCIEF, где независимый маркер из ProteinSimple, pI 7,05 Marker кат. № 102226 добавляют в мастер-микс (master mix) iCIEF в качестве внутреннего стандарта (2 М мочевины, 0,35% метилцеллюлозы, 3% амфолита 3–10). Электрофорограмма iCIEF с маркером 7,05 в качестве внутреннего стандарта в мастер-миксе показана на Фигуре 6 (верхняя панель), для калибровки используют ограничивающие маркеры pI 5,12 и pI 9,50 в мастер-микс. Нижняя панель на Фигуре 5 иллюстрирует электрофорограмму iCIEF RS VEGF–Trap,

наложенную на холостую пробу, содержащую маркер 7,05 в качестве внутреннего стандарта, который будут применять для идентификации Пика 5 в профиле образца iCIEF VEGF–Trap. Пик 7,05 маркера мигрирует при pI между пиками 4 и 5 и это будет служить для определения основного пика 6 в кластере основных изоформ VEGF–Trap (Пики 5, 6 и 7).

[0059] Вместо того, чтобы демонстрировать пики 3–9, как в методе IEF, метод iCIEF (в соответствии с некоторыми вариантами осуществления) демонстрируют гетерогенность заряда образца VEGF–Trap в процентах изоформ отличающихся зарядом вариантов, сгруппированных в область 1 (кислую), область 2 (нейтральную) и область 3 (основную). Кластер из трех основных пиков (номера пиков 5, 6 и 7) на электрофорограмме iCIEF VEGF–Trap, которые мигрируют вокруг нейтрального диапазона pI и которые соответствуют наиболее заметным изоформам, будут сгруппированы как область 2 (нейтральная). Среди кластера из трех пиков различимую изоформу, соответствующую главному пику 5, который мигрирует к конкретной pI, идентифицируют с использованием независимого маркера pI 7,05 в качестве внутреннего стандарта в инъекции холостой пробы, как показано на Фигуре 7. Область 1 (кислая) в образце iCIEF VEGF–Trap указывается как группа пиков, которые являются относительно кислыми по сравнению с кластером из трех основных пиков (Пики 5, 6 и 7) на электрофорограмме VEGF–Trap. Область 3 (основная) в образце iCIEF VEGF–Trap указывается как группа пиков, которые являются относительно основными по сравнению с кластером из трех основных пиков (Пики 5, 6 и 7) на электрофорограмме VEGF–Trap.

[0060] Подход к выдаче результатов с использованием области 1, 2 и 3 дает преимущество более жесткого контроля над изоформами отличающихся зарядом вариантов посредством мониторинга трех областей (Области 1, 2 и 3) в отличие от традиционного группирования полос 3–9 метода IEF на основе геля. Фигура 7B иллюстрирует различия между выдачей результатов IEF и выдачей результатов в соответствии с вариантами осуществления метода iCIEF по настоящему раскрытию. Кроме того, выдача результатов в случае областей 1, 2 и 3 дает методу анализа iCIEF уникальное преимущество в его чувствительности к изменениям в изоформах отличающихся зарядом вариантов намного раньше, чем в традиционном подходе. Это делает анализ iCIEF намного более чувствительным в его показаниях и лучшим показателем стабильности, чем предыдущая процедура анализа IEF. В Таблице 4 ниже приведен пример стабильности, указывая на способность нового подхода к группированию, принятого для метода анализа iCIEF в отличие от традиционной выдачи результатов 3–9 анализа IEF. Образцы VEGF–Trap, используемые в ускоренных испытаниях на стабильность, анализируют с применением нового анализа iCIEF с помощью двух подходов к отчетности – группированию по областям и пикам 3–9 аналогично методу анализа IEF и в сравнении с историческими результатами из метода анализа IEF.

[0061] В Таблице 4 (ниже) можно видеть, что подход к группированию по областям

1, 2 и 3 является намного более чувствительным и свидетельствует об изменениях в распределении отличающихся зарядом вариантов образца VEGF–Trap. Метод IEF показал изменение в распределении общего заряда с уменьшением на 2% в случае полос 3–9 и это изменение было сопоставимо с результатами метода анализа iCIEF при группировании с использованием подхода для пиков 3–9. Тем не менее, из Таблицы 4 видно, что для образца VEGF–Trap, используемого в ускоренных испытаниях со стрессовым воздействием 25°C, 5% увеличение в области 1 (или кислых вариантов) и сопутствующее снижение примерно на 5% для области 3 (основные варианты) наблюдают с применением анализа iCIEF. Эта тенденция, наблюдаемая в распределении заряда VEGF–Trap в анализе iCIEF, является точным отражением природы изменений, происходящих в образце VEGF–Trap, на основе его структуры и сложности паттерна заряда, обусловленной его различной степенью сialiрования. Увеличение кислотных вариантов (Область 1 – высокая степень сialiрованных частиц) образца VEGF–Trap с применением метода анализа iCIEF в ускоренных испытаниях с термическим стрессовым воздействием отражает возможное дезамидирование в сочетании с агрегацией. С другой стороны, группирование с использованием традиционных полос 3–9 с помощью метода IEF маскирует незаметные изменения, происходящие в отличающихся зарядом изоформах VEGF–Trap и оставляет мало места для контроля различных видов заряда, делая его не столь чувствительным, как способ детектирования незаметных изменений в гетерогенности заряда образца VEGF–Trap.

[0062] VEGF–Trap имеет десять сайтов гликозилирования. Цепи гликанов, прикрепленные к этим сайтам, являются разветвленными, а каждая ветвь может заканчиваться или не заканчиваться отрицательно заряженным сахарным мономером, сиаловой кислотой. Естественное изменение присутствия групп сиаловой кислоты на концах гликановых цепей приводит к ансамблю отличающихся зарядом вариантов VEGF–Trap, имеющих диапазон полного заряда. Пропорция этих полос варьируется в зависимости от обилия присутствующих заряженных видов. Таким образом, новый подход к отчетности о группировании различных видов зарядов, основанных на областях 1 (сильно сialiрованных), 2 (умеренно сialiрованных) и 3 (наименее сialiрованные) делает анализ iCIEF более чувствительным к изменениям, которые происходят в сialiльных формах образца VEGF–Trap.

Таблица 4

Условие стрессового воздействия	iCIEF			IEF	iCIEF
	% R1	% R2	% R3	% полос 3–9	% пиков 3–9
VEGF 25°C 1 месяц	31,90	43,09	25,01	82,94	87,48
VEGF 25°C 3 месяца	33,85	43,28	22,87	82,11	87,86
VEGF 25°C 6 месяца	37,25	42,47	20,28	80,42	85,15
Разница (%)	5,35	–0,62	–4,73	–2,52	–2,33

[0063] **Стабильность, указывающая на способность метода анализа iCIEF.**

Образец DP VEGF–Trap для долгосрочного испытания стабильности (выдерживают при температуре 2–8°C) анализируют с применением 7 независимых временных точек, охватывающих период времени 24 месяца; Таблица 5 (ниже) иллюстрирует данные, соответствующие этому исследованию. Исторические данные IEF для этих образцов VEGF–Trap предлагают для сравнения и сравнивают с данными iCIEF VEGF–Trap из группирования областей и выдачи результатов пиков 3–9. При условии хранения в режиме реального времени 2–8°C для образцов VEGF–Trap наблюдают незначительное изменение или отсутствие изменения, основываясь на исторических данных IEF, аналогичный тренд наблюдают при выдачи результатов с использованием подхода iCIEF к пикам 3–9.

Таблица 5 – Образец VEGF–Trap, проанализированный с применением iCIEF в режиме реального времени

Условие	Время	%R1	%R2	%R3	IEF (%3–9)	iCIEF (%3–9)
5°C	3 месяца	33,67	46,49	19,84	89,21	85,45
5°C	6 месяцев	32,90	47,14	19,96	87,09	85,26
5°C	9 месяцев	33,20	46,99	19,81	88,78	85,23
5°C	12 месяцев	33,71	47,05	19,24	91,37	85,12
5°C	15 месяцев	33,71	46,80	19,49	89,92	85,05
5°C	18 месяцев	33,89	47,00	19,11	88,27	85,25
5°C	24 месяца	34,14	46,87	18,99	89,79	85,03

[0064] Фигура 8 иллюстрирует подбор прямой % областей 1, 2 и 3 VEGF–Trap за период времени 24 месяца с применением iCIEF. Небольшое, но устойчивое увеличение области 1 с уменьшением области 3 видно на графиках.

[0065] Дополнительный анализ с применением подвергавшегося принудительному разложению образца DS VEGF–Trap осуществляют с применением нового метода анализа iCIEF. Для этого исследования термически разложенный образец DS VEGF, который разбавляли и подвергали стрессовым воздействиям при температуре 45°C в течение периода 15 дней, анализируют в моменты времени 0, 3, 9 и 15 дней с применением метода iCIEF (по областям и 3–9). Из Таблицы 6 (ниже) видно, что незначительное увеличение вариантов кислотного заряда (область 1) наблюдают для метода анализа iCIEF при группировке с использованием подхода по областям по сравнению с выдачей результатов для пиков 3–9 в гораздо более ранний момент времени для подвергавшегося принудительному разложению образца VEGF–Trap. В то время как выдача результатов для % 3–9 демонстрирует 2% изменение в распределении общего заряда по пикам 3–9, область 1 при тех же условиях показывала увеличение на 7%, тогда как область 3 показывала сопутствующее снижение на 8% с течением времени. Фигура 9 иллюстрирует электроферограмму подвергавшегося принудительному разложению образца VEGF–Trap с применением метода анализа iCIEF; увеличение кислых видов видно из профиля.

Таблица 6 – Процентное распределение подвергавшегося принудительному разложению образца VEGF–Trap, проанализированного с применением iCIEF (термическое стрессовое воздействие)

Условие стрессового воздействия	iCIEF			iCIEF
	% R1	% R2	% R3	% пиков 3–9
DS VEGF 45°C День 0	28,66	44,30	27,04	84,54
DS VEGF 45°C День 3	29,47	44,60	25,93	83,90
DS VEGF 45°C День 9	31,83	45,88	22,29	83,56
DS VEGF 45°C День 15	35,65	45,35	19,00	82,44
Разница (%)	6,99	1,05	–8,04	–2,10

[0066] Статистический анализ % распределения трех областей для образца VEGF–Trap, подвергавшегося стрессовому воздействию, осуществляют путем сравнения с соответствующим процентом пиков для не подвергавшегося стрессовому воздействию образца VEGF. На Фигуре 10А–10С показан статистический анализ подвергавшегося стрессовому воздействию образца VEGF–Trap для данных iCIEF. Статистически значимое изменение наблюдают для областей 1 и 3, соответственно.

[0067] На основе данных характеристики и оптимизации метода анализа iCIEF, получают параметры анализа и приводят их в Таблице 7 (ниже). Эти условия метода оценивают на линейность, точность, прецизионность и внутрилабораторную погрешность.

Таблица 7 – Критические параметры метода, полученные из экспериментов по разработке и оптимизации

Мочевина	2 М
Метилцеллюлоза	0,35%
амфолит 3–10	3%
VEGF–Trap	1,0 мг/мл
Предварительное фокусирование	1 мин. при 1500 В
Фокусирование	7 мин. при 3000 В

[0068] *Аттестация метода анализа iCIEF.* Линейность метода анализа iCIEF. Линейность метода оценивает один аналитик. Растворы образцов готовили с использованием стандартного образца VEGF–Trap при различных концентрациях белка 0,5 мг/мл, 1,0 мг/мл, 1,5 мг/мл и 2,0 мг/мл. В этом эксперименте, концентрацию белка в матрице образца изменяют от 0,5 до 2 мг/мл, сохраняя постоянными другие компоненты матрицы при 3% амфолита 3–10 и 0,35% метилцеллюлозы. Время фокусирования также остается постоянным на уровне 1+7 минут. В Таблице 8 обобщен процент распределения областей 1, 2 и 3 для образца VEGF–Trap в линейном диапазоне от 0,5 до 2,0 мг/мл. Линейный график концентрации зависимости от показателей площади для образца VEGF–

Трап предлагается на Фигуре 11.

Таблица 8 – линейность метода анализа iCIEF

RS VEGF–Трап (мг/мл)	% R1	% R2	% R3
0,5	29,51	46,44	24,05
0,5	29,79	46,38	23,84
1	29,66	45,88	24,46
1	30,03	45,94	24,02
1,5	30,27	45,83	23,91
1,5	29,68	45,95	24,37
2	29,54	46,31	24,15
2	29,57	46,26	24,17

[0069] Анализ демонстрирует приемлемую линейность в диапазоне концентрации белка от 0,5 мг/мл до 2,0 мг/мл с $R2 > 0,99$ на основании регрессионного анализа. Кроме того, распределение изоформы остается неизменной в этом же диапазоне концентраций. Это указывает на то, что анализ способен обеспечить согласованные результаты как по площади пика, так и по распределению изоформы в диапазоне концентраций белка от 0,5 до 2,0 мг/мл.

[0070] Точность метода анализа iCIEF. Точность метода оценивают на основе пропорциональности при разбавлении с использованием данных о линейности путем сравнения с номинальной концентрацией 1,0 мг/мл. Восстановление разведения на основе данных линейности показано в Таблице 9 ниже. Процент восстановления рассчитывают с использованием = (Процент области измерений/Процент номинальной площади) x 100%.

Таблица 9 – Точность анализа iCIEF VEGF–Трап на основе пропорциональности при разбавлении

RS VEGF–Трап (мг/мл)	Средний %			% восстановления		
	% R1	% R2	% R3	% R1	% R2	% R3
0,5	29,65	46,41	23,95	99,35	101,09	98,78
1	29,85	45,91	24,24	Номинальное		
1,5	29,98	45,89	24,14	100,44	99,96	99,59
2	29,56	46,29	24,16	99,03	100,82	99,67

[0071] Восстановление на основе пропорциональности при разбавлении в диапазоне концентрации белка от 0,5 до 2,0 мг/мл для образца VEGF–Трап составляло в пределах 98%–101% для трех областей.

[0072] Анализ внутрилабораторной погрешности метода iCIEF. Внутрилабораторную погрешность оценивают два разных аналитика (А, В) с применением препаратов на основе их соответствующих реагентов и используя два

устройства для анализа отличающихся зарядом вариантов iCE3 через четыре дня для образца RS VEGF–Trap. Результаты анализа приведены в Таблице 10 ниже.

Таблица 10 – Результаты анализа внутрилабораторной погрешности

Аналитик	% области 1	% области 2	% области 3
А	29,44	45,87	24,69
	30,53	45,08	24,39
	29,71	45,83	24,46
А	29,91	45,98	24,11
	29,50	46,18	24,31
	29,76	46,14	24,10
В	28,78	46,65	24,57
	29,40	46,22	24,38
	29,61	45,85	24,54
В	29,56	46,10	24,34
	30,01	45,85	24,15
	29,50	45,89	24,61
Общее среднее	29,64	45,97	24,39
Ст. откл.	0,42	0,37	0,20
% ОСО	1,40	0,80	0,81

[0073] Предлагаемый метод исследования iCIEF VEGF–Trap демонстрирует приемлемую прецизионность при выполнении разными аналитиками с использованием разных препаратов на основе реагентов. Рассчитывают общий % ОСО и он составляет в пределах ОСО 2% для всех трех областей.

[0074] Робастность метода анализа iCIEF. Несколько элементов робастности метода анализа оценивали с помощью различных экспериментов. Эти эксперименты приведены в Таблице 11.

Таблица 11 – Краткое изложение экспериментов по робастности метода

Эксперименты по робастности	Оценка производительности
Стабильность приготовленного раствора	Постоянство распределения изоформы в течение 24 часов по сравнению со временем T=O
Оценка других образцов амфолита 3–10	Постоянство в общем профиле и % распределения по трем областям
Данные индикации стабильности	Влияние стрессового воздействия на распределение изоформы

[0075] Стабильность приготовленного раствора в устройстве. Стабильность раствора оценивают путем получения образца из стандартного образца в матрице образца и анализа образца с применением iCIEF. Образец хранят в приборе для iCE3 после анализа при температуре 10°C в матрице, состоящей из 3% амфолита 3–10, 0,35% метилцеллюлозы и 2 М мочевины. Образец анализируют еще раз через приблизительно 24 часа. Распределение изоформы для каждого анализа представляют ниже в Таблице 12 ниже.

Таблица 12 – Результаты стабильности приготовленного образца iCIEF в устройстве.

Название образца	% области 1	% области 2	% области 3
инъекция 1 RS VEGF в момент времени 0	29,49	45,72	24,80
инъекция 2 RS VEGF в момент времени 0	29,88	45,62	24,50
инъекция 1 RS VEGF в момент времени 24 часа	29,52	45,92	24,56
инъекция 2 RS VEGF в момент времени 24 часа	29,95	45,74	24,31
% разницы	0,46	0,30	0,49

[0076] Абсолютную разницу между образцом, проанализированным в момент времени T=0, и проанализированным еще раз в момент времени T=24 часов, рассчитывают на основе диапазона (Максимум и Минимум), наблюдаемого в каждый момент времени. Абсолютная разница была равной или составляла менее 0,5% для трех областей. Это свидетельствует о том, что образец является стабильным в матрице в течение до 24 часов при условии хранения при температуре 10°C в анализаторе отличающихся зарядом вариантов iCE3.

[0077] Оценка образцов амфолита (3–10). Анализировали несколько образцов амфолита 3–10 из одного источника. Общий профиль отличающихся зарядом вариантов образца VEGF–Trap, проанализированный с использованием разных образцов, был сопоставим. Незначительные различия в профиле электроферогаммы с точки зрения паттерна пиков наблюдали в области 1 для некоторых образцов амфолита, однако процент распределения был сходным и находился в пределах варьирования результатов анализа. Репрезентативные электроферогаммы из трех образцов амфолита приведены на Фигуре 12.

[0078] Пример– Анализ исторических образцов варианта VEGF–Trap (DS, FDS и DSI) с применением нового метода анализа iCIEF

[0079] В целях дальнейшего установления робастности метода анализа iCIEF, с применением iCIEF, используя два образца амфолита, анализировали в общей сложности

37 уникальных исторических образцов VEGF–Trap, которые не связаны своим происхождением. Анализ включал 15 DSI VEGF–Trap (интермедиат лекарственной субстанции, водный буферный раствор, pH 6,2, содержащий 5 mM фосфата натрия, 5 mM цитрата натрия и 100 mM хлорида натрия), 10 образцов DS VEGF–Trap (лекарственная субстанция C701 SPEC, водный буферный раствор, pH 6,2, содержащий 10 mM фосфата натрия) и 12 образцов FDS VEGF–Trap (лекарственная субстанция в сформированной смеси, водный буферный раствор C713 SPEC, pH 6,2, содержащий 10 mM, фосфата натрия, 40 mM хлорида натрия, 0,03% (масс./об.) полисорбат 20 и 5% (масс./об.) сахарозы). Эти образцы VEGF–Trap анализировали с применением метода анализа iCIEF.

[0080] Амфолиты представляют собой смесь разных гомологов амфотерных соединений со спектром изоэлектрических точек между 3 и 10, которые помогают установить градиент pH под воздействием электрического поля. Амфолит 3–10, применяемый в методе анализа iCIEF приобретали из одного источника, который обычно производит партиями. Основываясь на рекомендации поставщика вместе с нашими практическими знаниями по анализу iCIEF для других белков, наблюдаются небольшие различия между различными образцами, и это неизбежно. Следовательно, чтобы установить робастность нового анализа iCIEF в различных амфолитных образцах, анализируют два образца амфолита. Образцы VEGF со стадии продуктов DS, DSI и FDS анализировали с использованием предлагаемого подхода к группированию по областям (R1, R2 и R3), а также на основе группирования пиков 3–9, аналогичного методу анализа IEF. Фигуры 13A–13C демонстрируют статистический анализ образцов амфолита в качестве функции % области 1, 2 и 3 и пиков 3–9 для образцов DS, DSI и FDS VEGF–Trap. Данные, соответствующие 37 образцам VEGF–Trap, предлагаются в Таблице 13 для одного из образцов амфолита. Таблицы 14–16 предлагают полный набор данных для 37 образцов.

Таблица 13 – Исторические образцы DSI, DS и FDS VEGF–Trap анализировали с применением процедуры анализа iCIEF

Образец DSI VEGF Trap	% R1	% R2	% R3	% от 3 до 9 пиков
1	29,7	43,6	26,7	82,7
2	28,5	43,6	28,0	83,5
3	28,0	44,3	27,7	84,2
4	28,1	44,2	27,8	83,9
5	28,7	44,9	26,4	84,6
6	27,6	44,2	28,2	84,0
7	23,7	41,8	34,6	81,7
8	26,8	43,1	30,1	82,9
9	28,5	45,2	26,4	85,0

10	27,2	44,1	28,7	84,0
11	28,5	45,2	26,4	85,0
12	27,9	44,3	27,8	84,4
13	28,0	43,7	28,3	83,7
14	27,8	42,9	29,3	83,3
15	29,2	44,7	26,1	84,3
16	29,0	44,0	27,0	84,2
17	28,9	43,7	27,4	83,8
18	30,6	44,3	25,1	84,1
19	29,7	43,9	26,4	83,8
20	29,9	43,7	26,4	83,3
21	29,1	43,9	27,1	84,1
22	27,1	44,8	28,1	85,3
23	30,4	44,7	24,9	84,8
24	28,3	43,7	28,1	83,2
25	27,3	43,3	29,5	83,2
26	28,0	42,3	29,6	81,8
27	27,2	45,2	27,6	85,8
28	30,1	43,4	26,5	84,1
29	29,2	44,1	26,7	84,0
30	29,8	43,4	26,8	83,3
31	29,7	44,7	25,7	84,6
32	32,3	45,3	22,4	84,5
33	33,4	44,4	22,2	83,8
34	33,6	45,2	21,1	84,5
35	31,0	45,2	23,8	85,3
36	33,8	42,1	24,1	81,3
37	29,2	42,2	28,6	82,2
38	28,2	41,9	29,9	81,8
39	28,7	42,9	28,4	82,8

Таблица 14 – партии DSI, проанализированные по образцам Pharmalyte

Образцы DSI VEGF Trap	% R1	% R2	% R3	% от 3 до 9 пиков
1	30,2	43,1	26,7	87,9

2	27,8	44,4	27,8	88,8
3	28,0	44,5	27,6	88,9
4	27,9	44,4	27,8	88,7
5	28,8	44,8	26,4	85,3
6	27,5	44,3	28,2	87,1
7	23,7	41,4	34,9	89,7
8	26,9	42,9	30,2	88,4
9	28,5	45,1	26,4	89,3
10	27,6	43,9	28,4	88,7
11	28,3	44,9	26,8	88,3
12	28,1	44,6	27,3	87,8
13	28,2	43,7	28,1	87,8
14	27,6	43,5	28,9	87,9
15	29,3	44,7	26,0	89,2

Таблица 15 – партии DS, проанализированные по образцам Pharmalyte

Образцы DS VEGF Trap	%R1	%R2	%R3	% от 3 до 9 пиков
1	28,8	44,7	26,4	89,3
2	29,4	44,3	26,3	89,2
3	29,2	44,5	26,2	88,9
4	27,3	43,4	29,2	88,2
5	29,6	44,0	26,4	88,9
6	28,3	43,8	27,9	88,8
7	26,7	45,3	28,1	89,8
8	30,2	45,1	24,7	90,1
9	30,5	44,5	25,0	89,3
10	29,1	43,9	27,0	89,3
11	27,9	42,5	29,5	87,5

Таблица 16 – партии FDS, проанализированные по образцам Pharmalyte

Образцы FDS VEGF Trap	%R1	%R2	%R3	% пиков с 3 по 9
1	27,5	45,0	27,5	90,0
2	30,0	43,5	26,5	88,7
3	29,1	43,7	27,2	89,1

4	30,2	43,0	26,7	88,4
5	29,8	44,6	25,6	89,8
6	32,5	45,4	22,1	90,3
7	33,3	44,7	22,0	89,6
8	33,6	45,4	21,0	90,9
9	30,7	45,5	23,8	90,1
10	34,2	41,7	24,2	87,2
11	29,0	42,4	28,6	87,2
12	28,4	41,3	30,3	86,5
13	28,5	42,5	29,1	87,6

[0081] Анализ согласованных пар (Фигура 13D) осуществляли на основе данных, собранных для образцов амфолита для области 1, 2 и 3 и подхода к группированию 3–9. Анализ данных от согласованных пар применяли для сравнения средних значений между двумя амфолитами и для оценки любой разницы в выдаче результатов анализа, которые могут наблюдаться из-за внутренних различий в образцах амфолитов. Основываясь на данных, можно сделать вывод, что максимальная наблюдаемая средняя разница между образцами для трех областей R1, R2 и R3 составляет менее 0,1%, если указывается в случае с областями. Кроме того, на основании значения p можно сделать вывод, что % распределения по области 1, 2 и 3 между двумя образцами амфолитов с использованием подхода по областям не является статистически значимым.

[0082] Однако, когда набор данных VEGF–Trap для образцов DS, DSI и FDS анализировали с использованием подхода к группированию пиков 3–9 аналогично методу анализа IEF, между некоторыми образцами амфолитов наблюдается статистически значимая разница. Например, между некоторыми образцами, средняя разница достигает 4,8%, если указывается в случае с пиками 3–9 для метода анализа iCIEF. Фигуры 13A–13D демонстрирует профили iCIEF, полученные с применением различных образцов амфолита, а из изображений видно, что изменчивость, наблюдаемая между образцами амфолита, ограничена кислой областью и путем группирования областей 1, 2 и 3 эта изменчивость маскируется. Это делает подход по областям к выдаче результатов для анализа iCIEF робастным и воспроизводимым подходом.

[0083] Данные из анализа образца DSI, DS и FDS с применением образцов амфолита, основываясь на группировании % областей 1, 2 и 3, делают анализ iCIEF более робастным методом анализа.

[0084] Соответственно, система, способы и устройства iCIEF, представленные в этом раскрытии, количественно определяют профиль отличающихся зарядом вариантов лекарственной субстанции VEGF–Trap, интермедиата лекарственной субстанции, лекарственной субстанции в сформированной смеси и лекарственного продукта. Подобные варианты осуществления могут служить для замены одобренного в настоящее

время метода IEF на основе геля для анализа гетерогенности заряда VEGF–Trap.

[0085] Отличающиеся зарядом варианты VEGF–Trap, фракционированные с использованием фракционатора OFFGEL 3100, позволяют продемонстрировать корреляцию между пиками, полученными в методе анализа iCIEF на основе капилляров, с полосами, разрешенными в процедуре анализа IEF на основе геля. Путем анализа фракций VEGF–Trap в электрофорезе OFFGEL по отдельности и с помощью резких скачков в исследованиях достигают прямое сравнение отдельных пиков iCIEF с полосами отличающихся зарядом вариантов IEF VEGF–Trap. Исследования подтвердили, что новая процедура анализа iCIEF способна разделить все изоформы отличающихся зарядом вариантов, ранее разделенных с использованием метода IEF на основе геля эквивалентным и более точным методом.

[0086] Соответственно, некоторые варианты осуществления этого подхода к результатам на основе распределения процента областей 1, 2 и 3, раскрытых в настоящем документе, позволяют контролировать все изоформы VEGF–Trap и делают анализ более чувствительным, позволяя ему быть робастным анализом стабильности.

[0087] Капилляры для применения с методами iCEF также описаны в настоящем документе. В общем, капилляр iCIEF, сконфигурированный для применения в анализе отличающихся зарядом вариантов VEGF–Trap, и он включает капилляр, сконфигурированный для получения белка, и сконфигурированный со смесью амфолита–носителя, метилцеллюлозы и стабилизирующей добавки. Капилляр также может содержать фторуглеродное покрытие.

[0088] В некоторых вариантах осуществления предлагается набор iCIEF, сконфигурированный для применения в анализе отличающихся зарядом вариантов VEGF–Trap, и он содержит один или более капилляров, сконфигурированных для получения белка и сконфигурированных со смесью амфолита–носителя, метилцеллюлозы и стабилизирующей добавки, причем капилляр содержит фторуглеродное покрытие.

[0089] Несмотря на то, что различные патентоспособные варианты осуществления были описаны и проиллюстрированы в настоящем документе, специалисты в данной области техники легко определяют множество других способов, и/или структур для обеспечения функции, и/или получения результатов, и/или одного или более преимуществ, описанных в настоящем документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема вариантов осуществления описанного в настоящем документе изобретения. В целом, специалисты в данной области техники легко поймут, что все параметры, количества, проценты, концентрации, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящем документе подразумевают, что фактические параметры, количества, проценты, концентрации, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или приложений, для которых используются патентоспособные идеи. Специалист в данной области техники поймет или будет в состоянии определить множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, с применением не более

чем рутинных экспериментов. Следовательно, следует понимать, что вышеизложенные варианты предоставлены исключительно в качестве примера. Патентоспособные варианты осуществления, раскрытые в настоящем документе, могут быть реализованы на практике иным образом, чем это описано и заявлено. Патентоспособные варианты осуществления по настоящему раскрытию также включают отдельные признаки, систему, препарат, материал, набор и способы, описанные в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация из двух или более таких признаков, систем, препаратов, материалов, наборов и способов также является патентоспособной (если они не являются взаимно несовместимыми). Некоторые варианты осуществления могут отличаться от предшествующего уровня техники, тем, что в частности отсутствуют один или более признаков/элементов/функциональных возможностей (то есть претензии, направленные на такие варианты, могут включать отрицательные ограничения).

[0090] Кроме того, как отмечено, различные идеи изобретения могут быть воплощены в качестве одного или более способов. Действия, выполняемые как часть метода, могут осуществляться любым подходящим способом. Соответственно, могут быть построены варианты осуществления, в которых действия выполняются в порядке, отличном от проиллюстрированного, что может включать выполнение некоторых действий одновременно, даже если они показаны как последовательные действия в иллюстративных вариантах осуществления.

[0091] Любые и все ссылки на публикации или другие документы, представленные где-либо в настоящей заявке, включены в настоящий документ посредством ссылки во всей их полноте. Кроме того, следует понимать, что все определения, как они определены и используются в настоящем документе, контролируют определения из словаря, определения в документах, включенных в качестве ссылки, и/или обычные значения определенных терминов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ анализа отличающихся зарядом вариантов сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF–Trap, который включает:

загрузку образца белка в разделительный капилляр, который содержит смесь, по меньшей мере, амфолита–носителя, метилцеллюлозы и стабилизирующей добавки;

прикладывание первого напряжения в течение первого заранее определенного периода времени таким образом, что амфолит–носитель образует градиент pH в пределах капилляра;

прикладывание второго напряжения в течение второго заранее определенного периода времени для фокусирования миграции отличающихся зарядом вариантов белка в пределах капилляра таким образом, что общий заряд вариантов является нейтральным; и

детектирование и количественное определение отличающихся зарядом вариантов белка.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что:

детектирование и количественное определение отличающихся зарядом вариантов включает:

измерение поглощения множества изоформ отличающихся зарядом вариантов;

разделение множества изоформ отличающихся зарядом вариантов на изолированные области, включающие, по меньшей мере, первую кислую/кислотную область (R1), вторую нейтральную область (R2) и третью основную/щелочную область (R3); и

определение процента изоформ отличающихся зарядом вариантов, попадающих в пределы каждой из областей R1, R2 и R3.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что осуществляют как детектирование, так и количественное определение отличающихся зарядом вариантов.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что детектирование отличающихся зарядом вариантов происходит при длине волны приблизительно 280 нм.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация белка, загруженного в капилляр, составляет приблизительно 2,0 мг/мл.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что стабилизирующая добавка содержит мочевины.

7. Способ по п. 5, отличающийся тем, что количество мочевины в смеси составляет приблизительно 2 М.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что смесь содержит приблизительно 0,35% метилцеллюлозы.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что первое напряжение составляет 1500 В.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что первое заранее определенное время составляет приблизительно 1 минуту.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что второе напряжение составляет 3000 В.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что второе заранее определенное время

составляет приблизительно 7 минут.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация белка, загруженного в капилляр, составляет приблизительно от 1,0 до 8,0 мг/мл или находится в любом промежуточном интервале.

14. Способ по п. 6, отличающийся тем, что количество мочевины в смеси составляет более 0 М и менее приблизительно 8 М или находится в любом промежуточном интервале.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что смесь содержит от приблизительно 0,01% до приблизительно 0,35% метилцеллюлозы или находится в любом промежуточном интервале.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что первое напряжение составляет от приблизительно 1 В до около 3000 В или находится в любом промежуточном интервале.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что первое заранее определенное время составляет от приблизительно 1 секунды до приблизительно 5 минут или находится в любом промежуточном интервале.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что второе напряжение составляет от около 1 В до приблизительно 6000 В или находится в любом промежуточном интервале.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что второе заранее определенное время составляет от приблизительно 1 минуты до приблизительно 14 минут или находится в любом промежуточном интервале.

20. Капилляр iCIEF, сконфигурированный для применения в анализе отличающихся зарядом вариантов VEGF-Trap, включает:

капилляр, сконфигурированный для получения белка и сконфигурированный со смесью амфолита–носителя, метилцеллюлозы и стабилизирующей добавки,

причем капилляр содержит фторуглеродное покрытие.

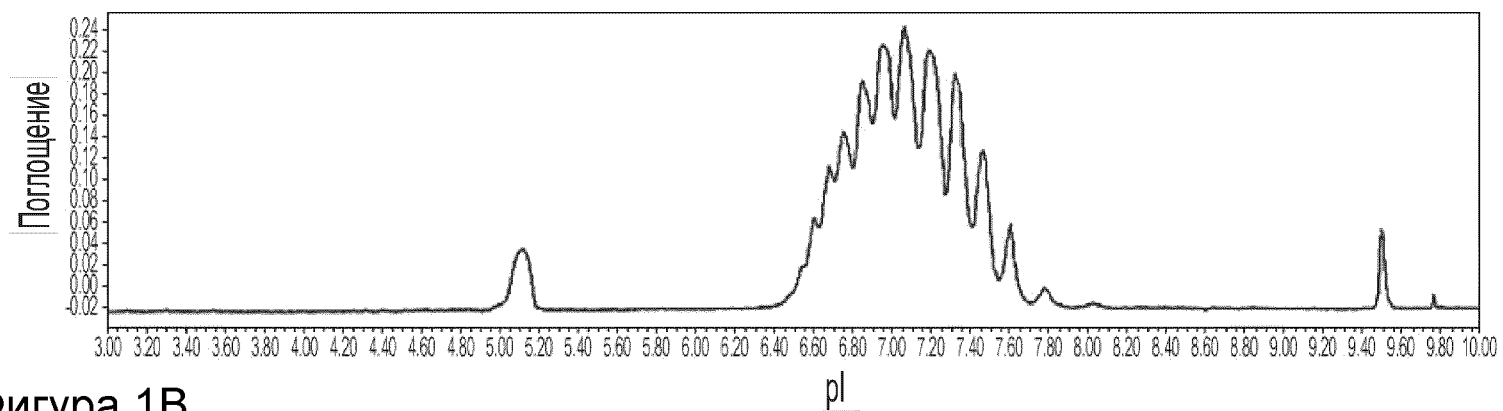
21. Капилляр по п. 20, отличающийся тем, что его компоненты соответствуют любому из пп. 2–19.

22. Набор iCIEF, сконфигурированный для применения в анализе отличающихся зарядом вариантов VEGF-Trap, содержащий один или более капилляров по любому из пп. 19–20.

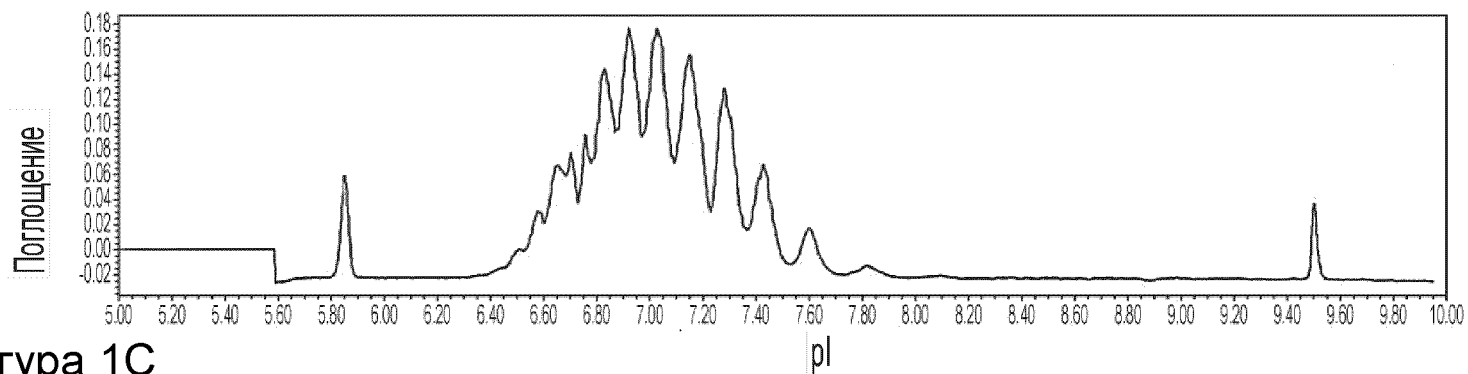
23. Система для осуществления способов по любому из пп. 1–19.

По доверенности

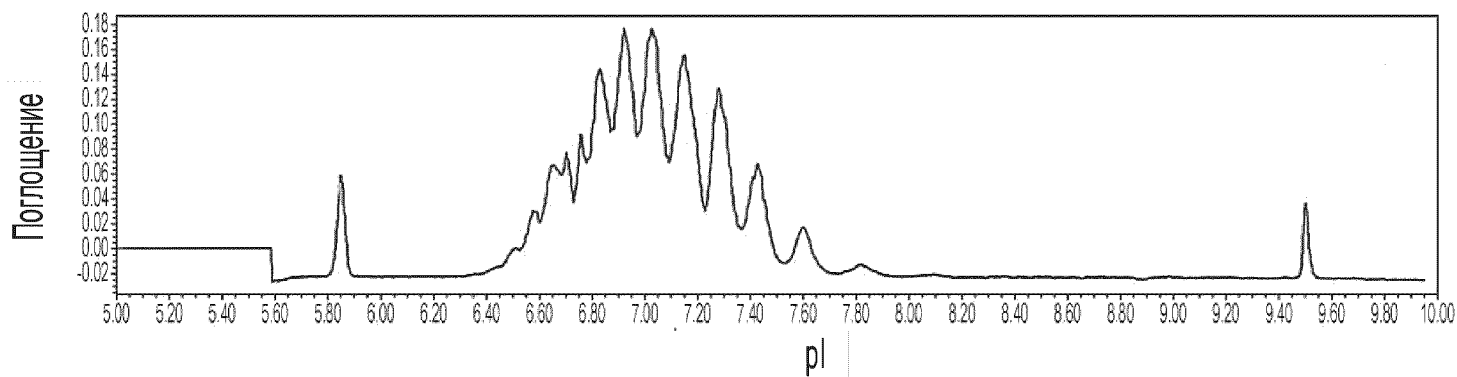
Фигура 1А



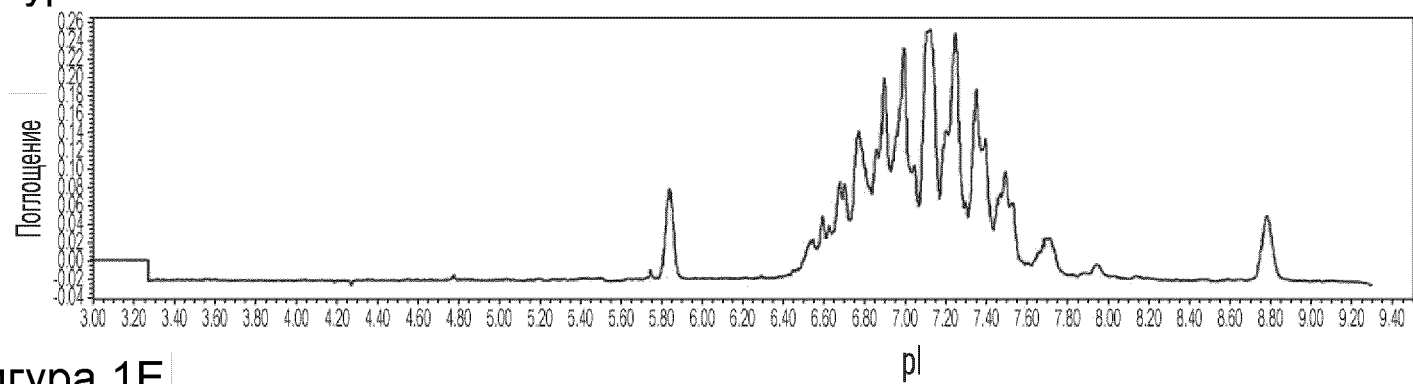
Фигура 1В



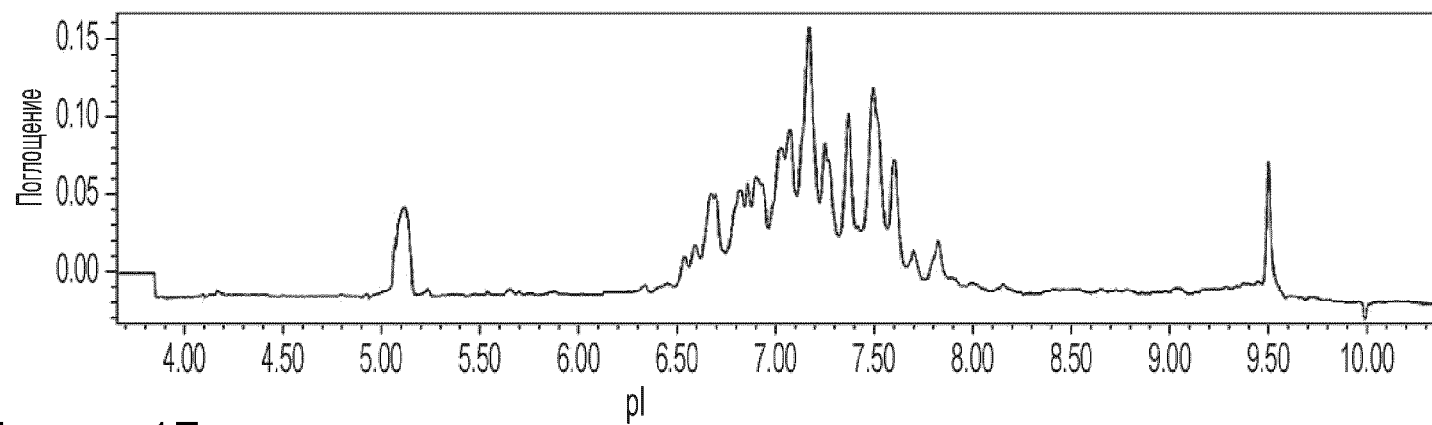
Фигура 1С



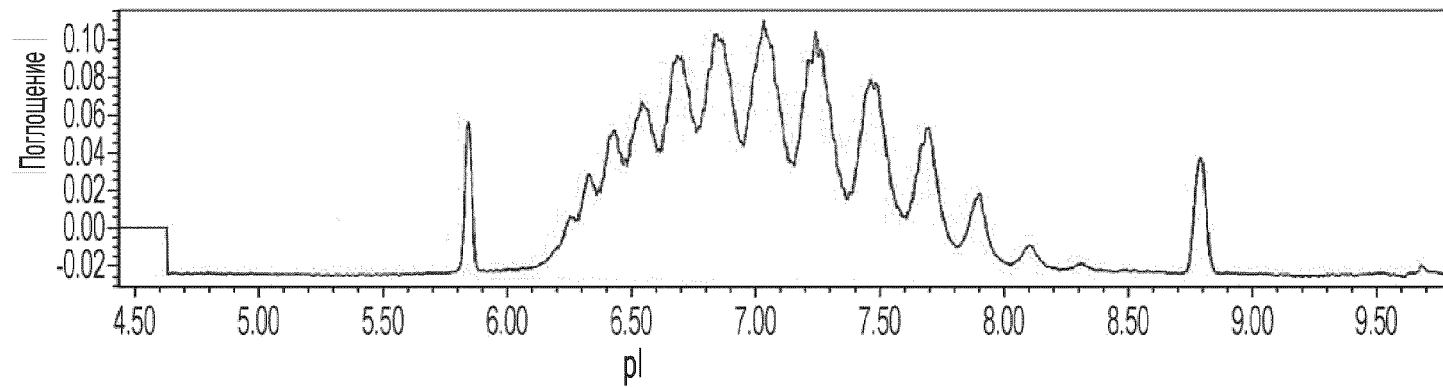
Фигура 1D



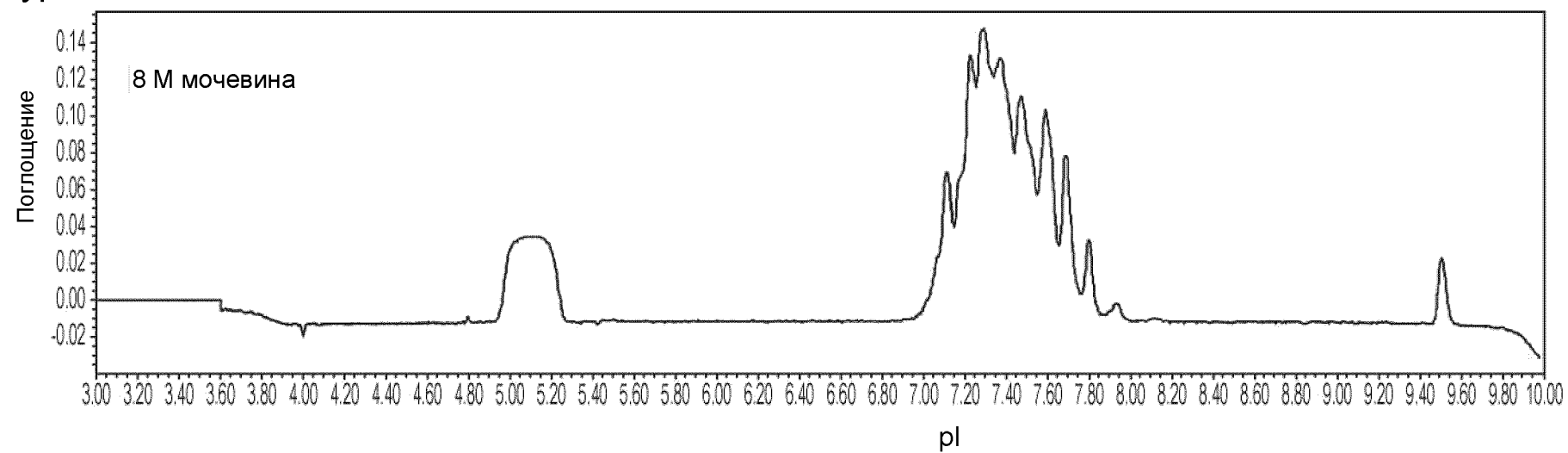
Фигура 1E



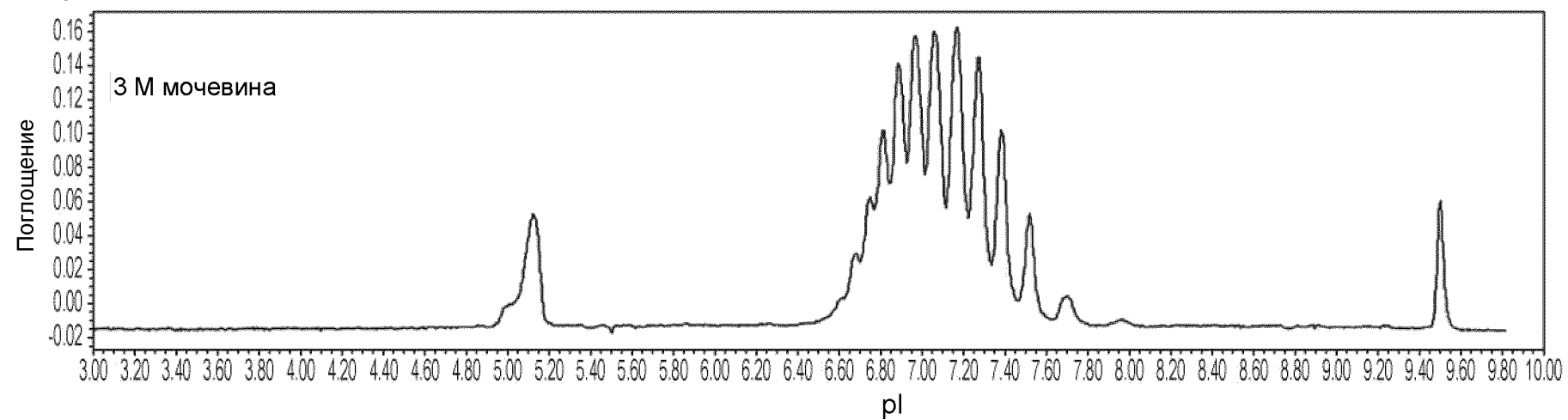
Фигура 1F



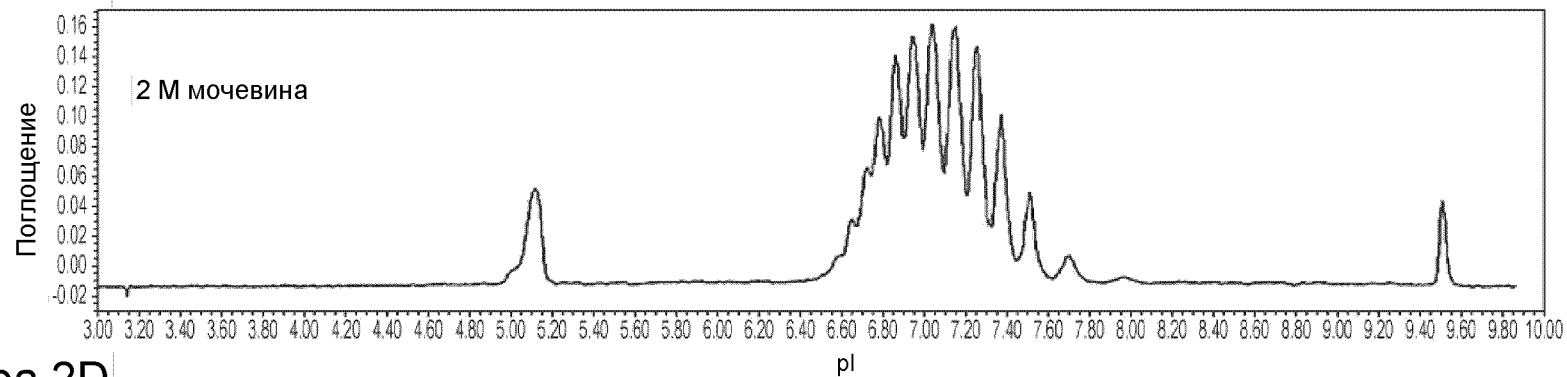
Фигура 2А



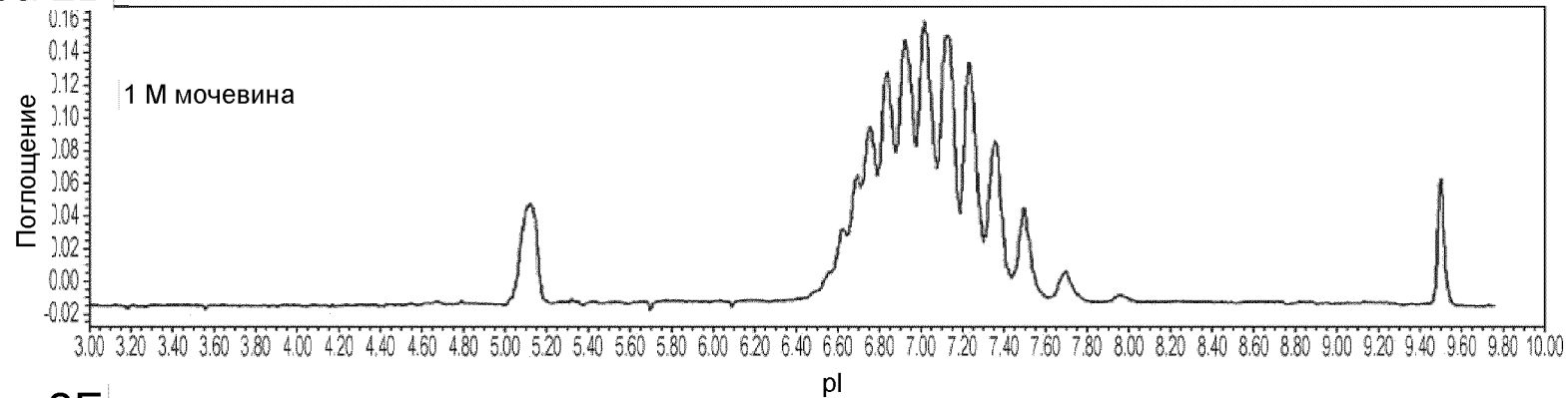
Фигура 2В



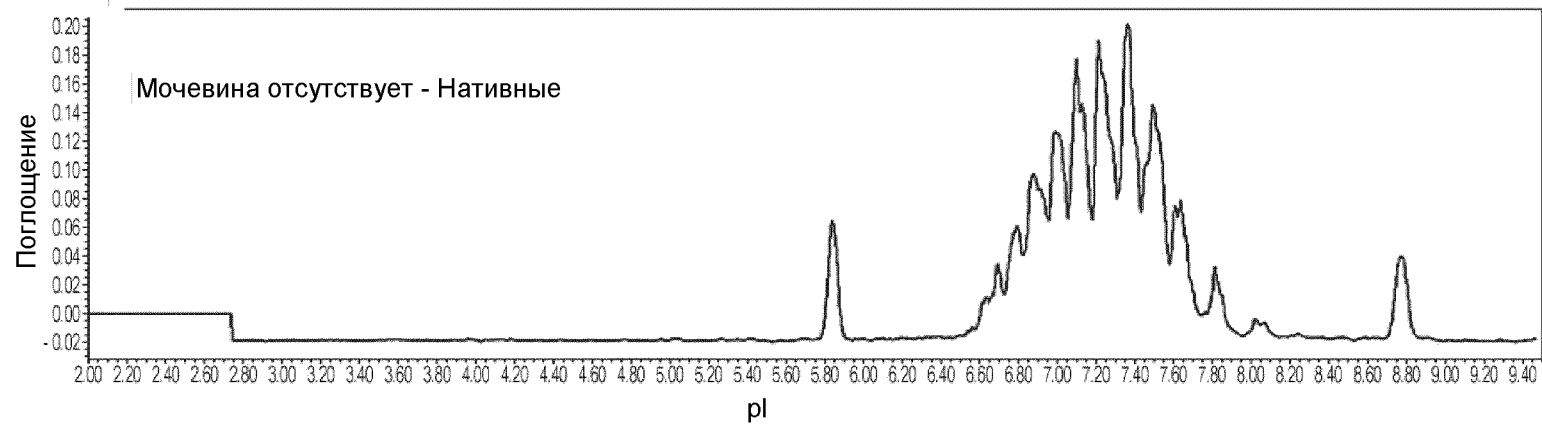
Фигура 2С

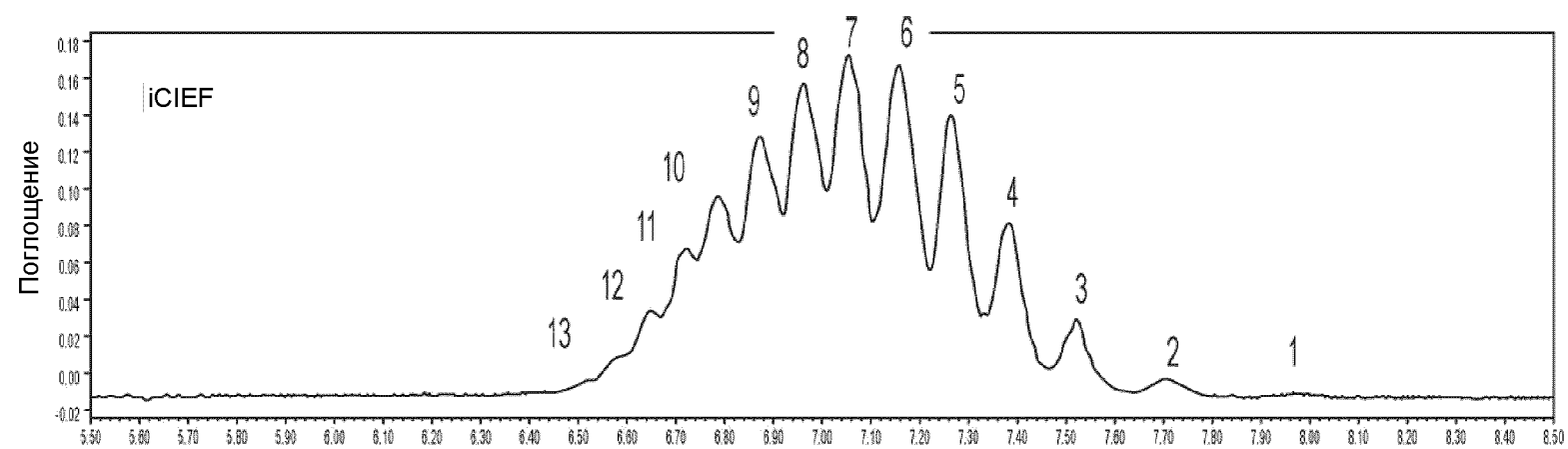


Фигура 2D

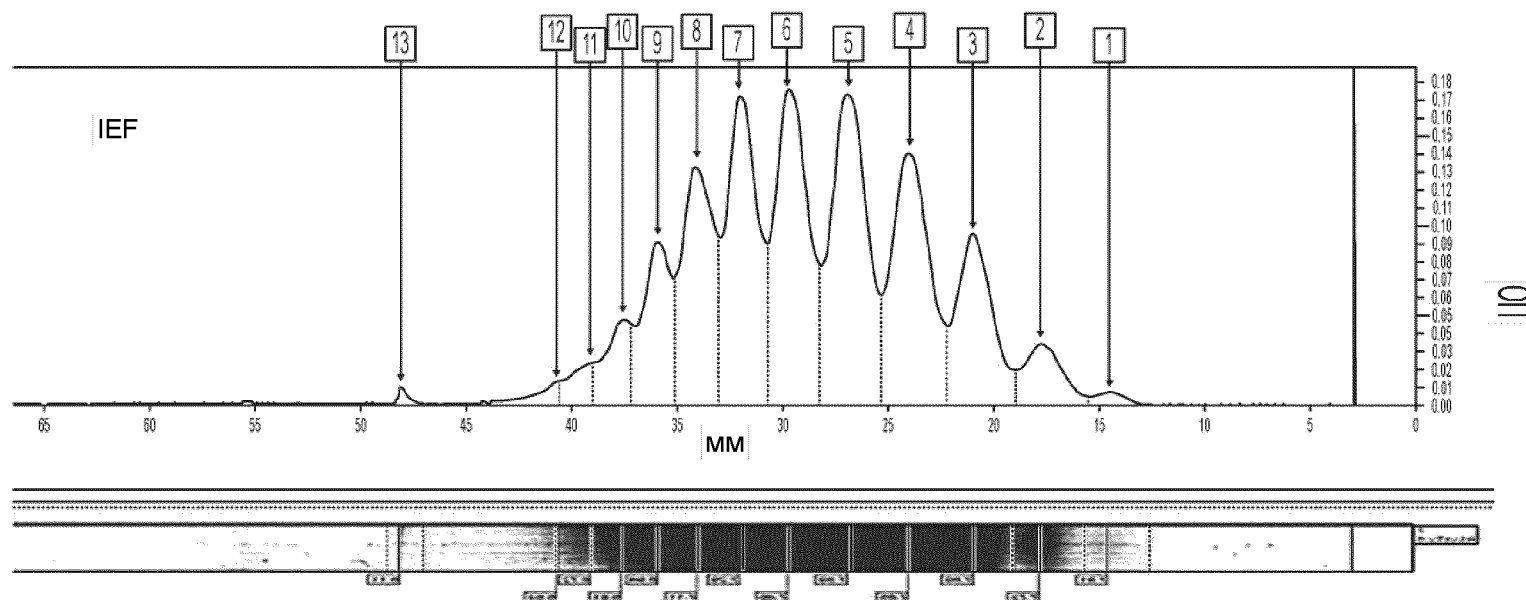


Фигура 2Е

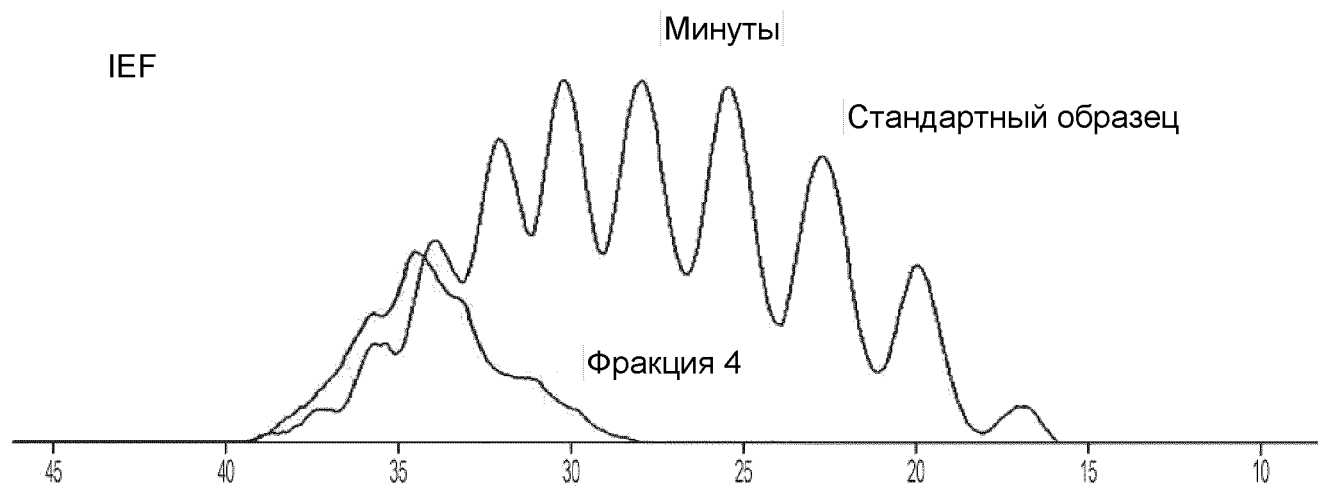
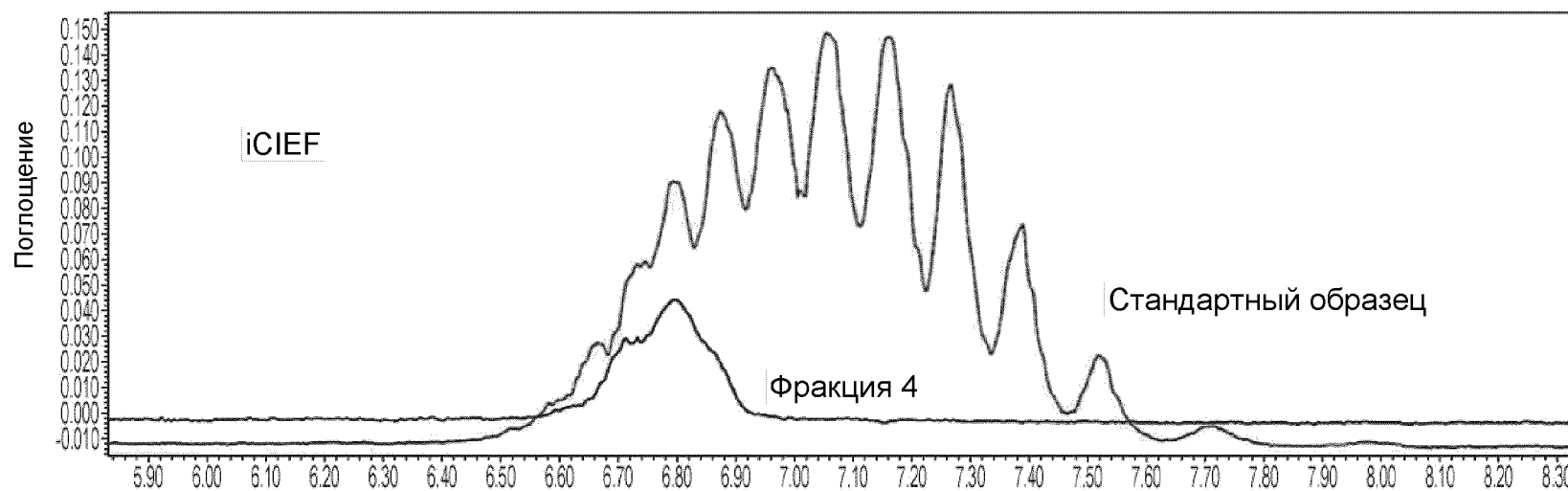




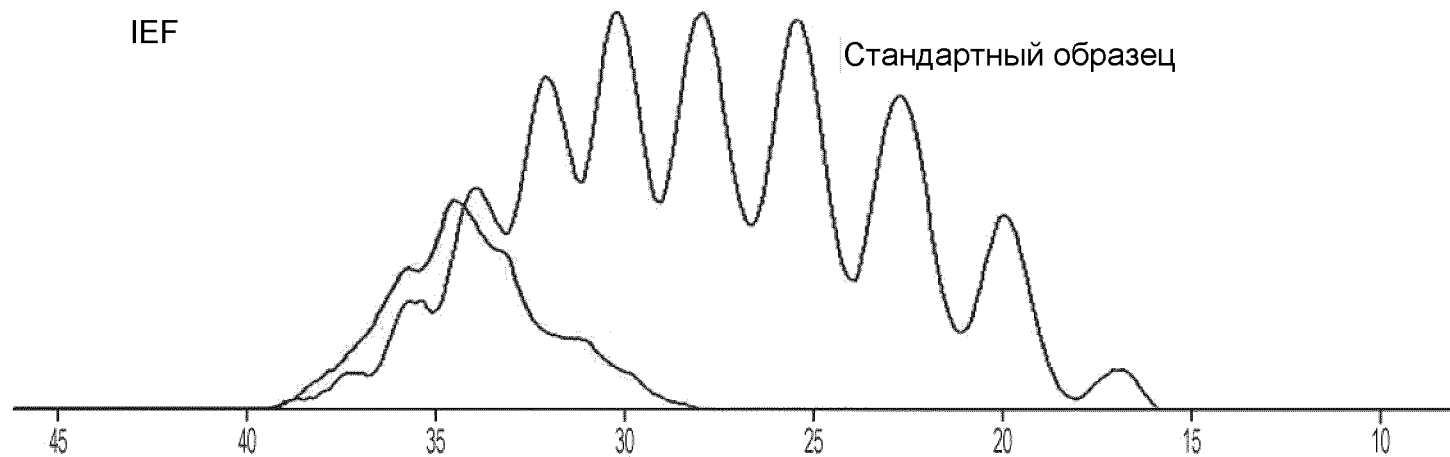
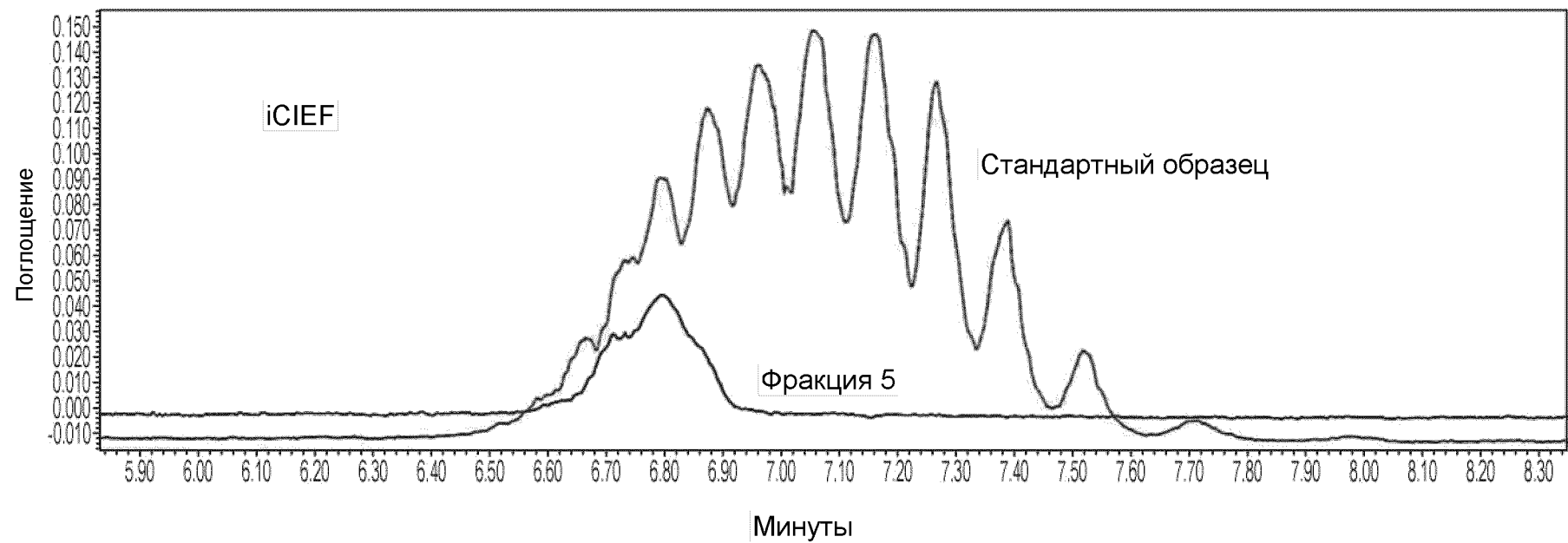
Полосы 3-9 сгруппированы



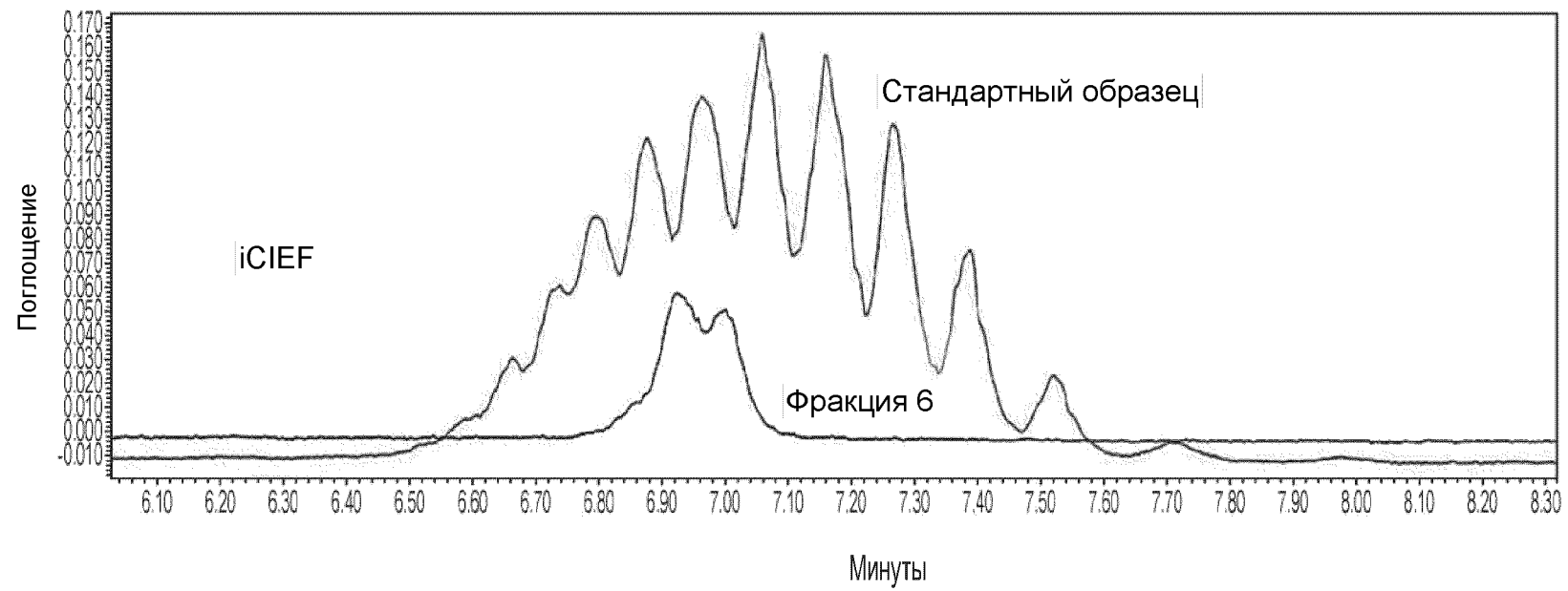
Фигура 3



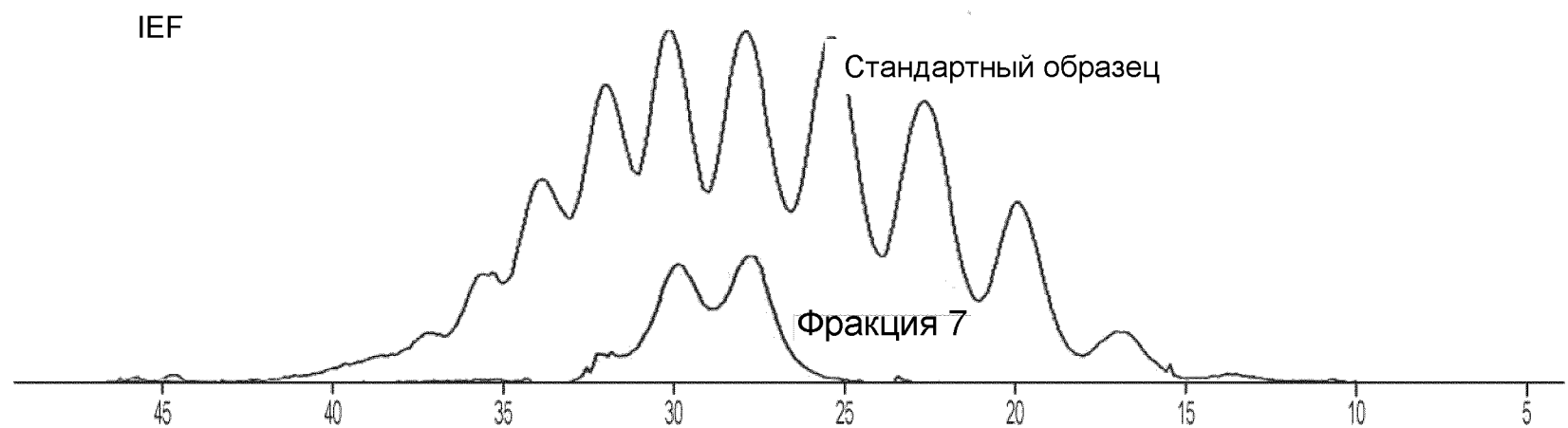
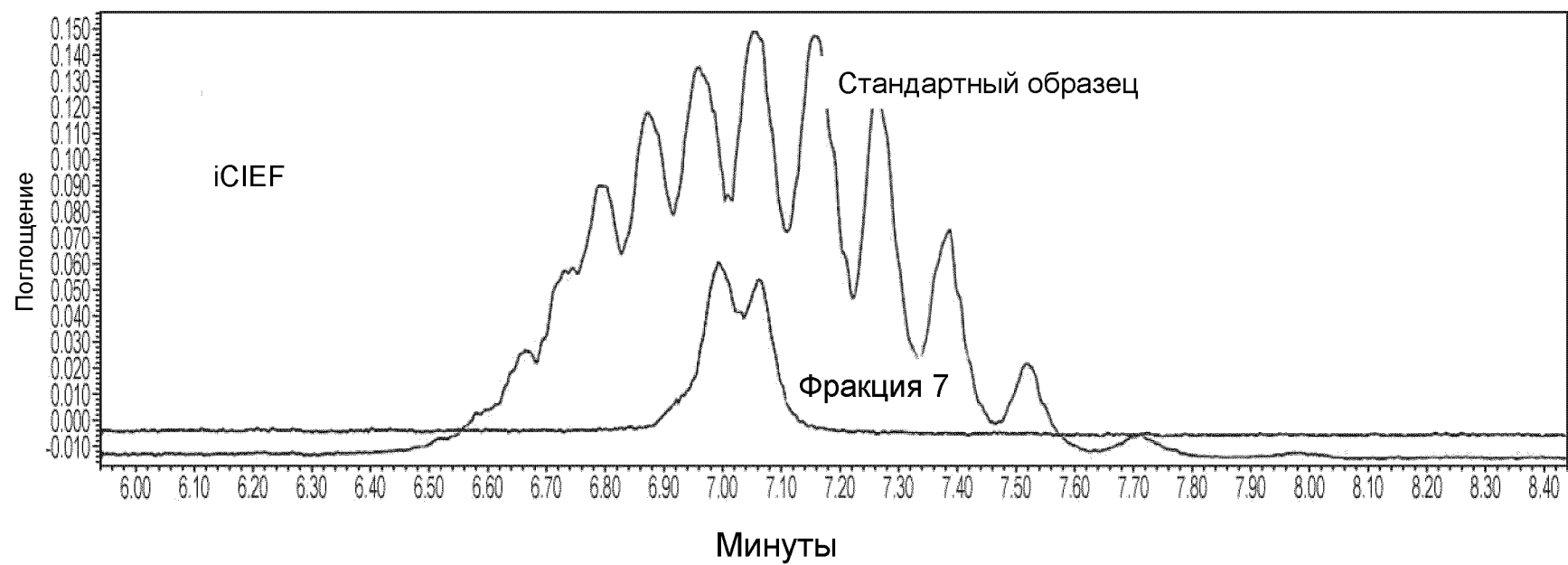
Фигура 4А



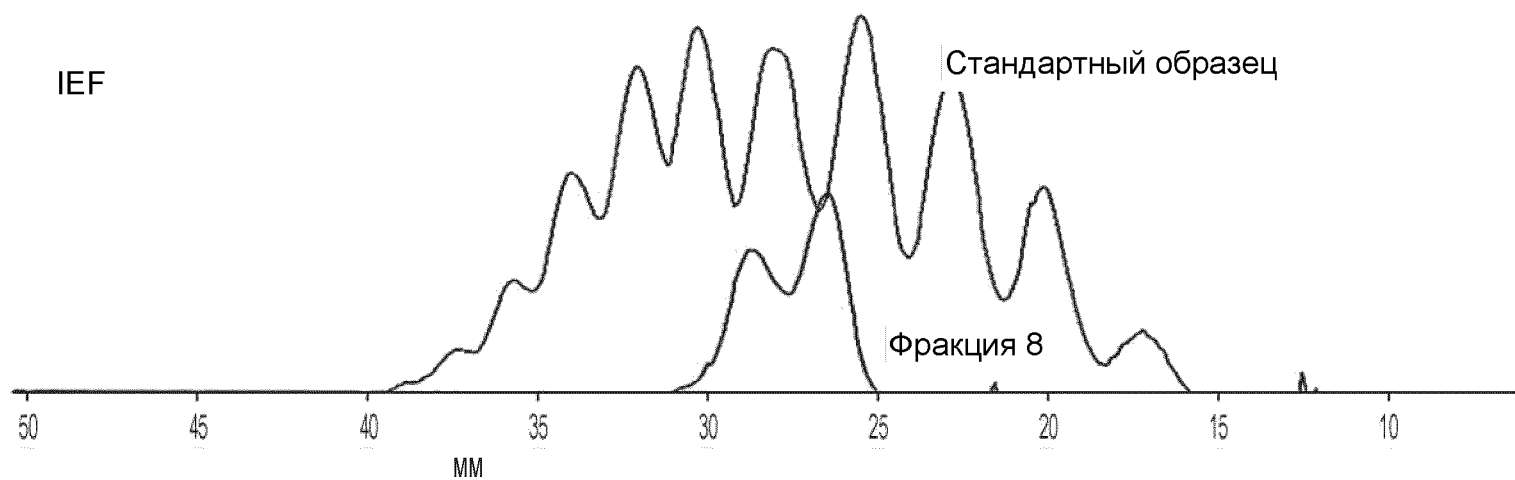
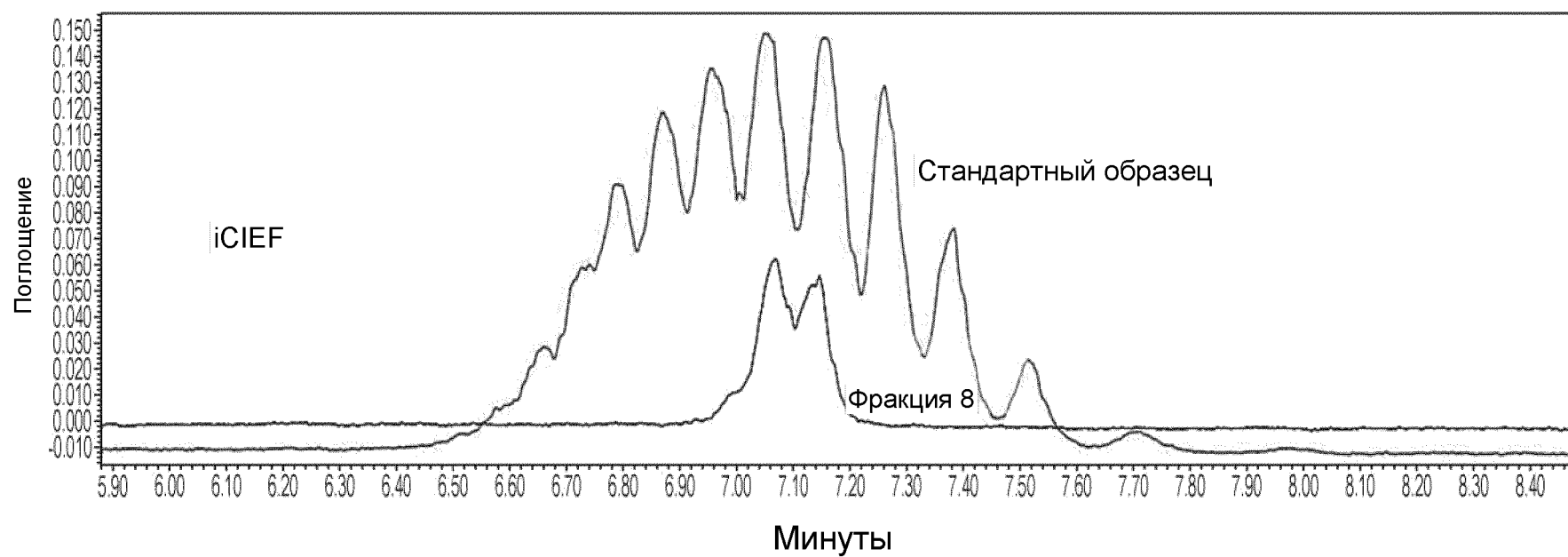
Фигура 4В



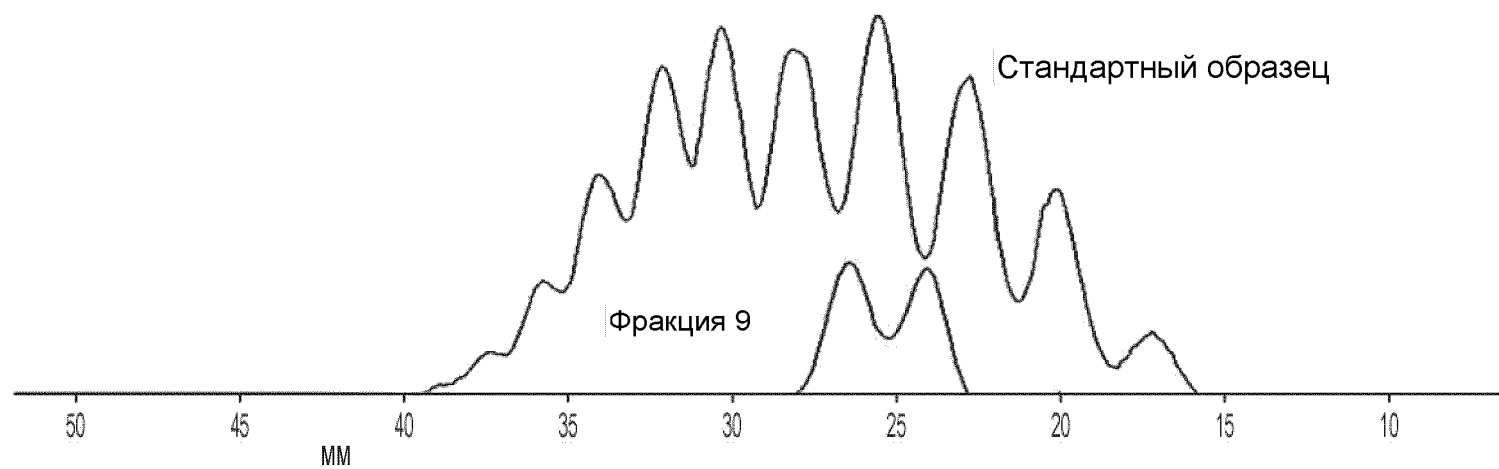
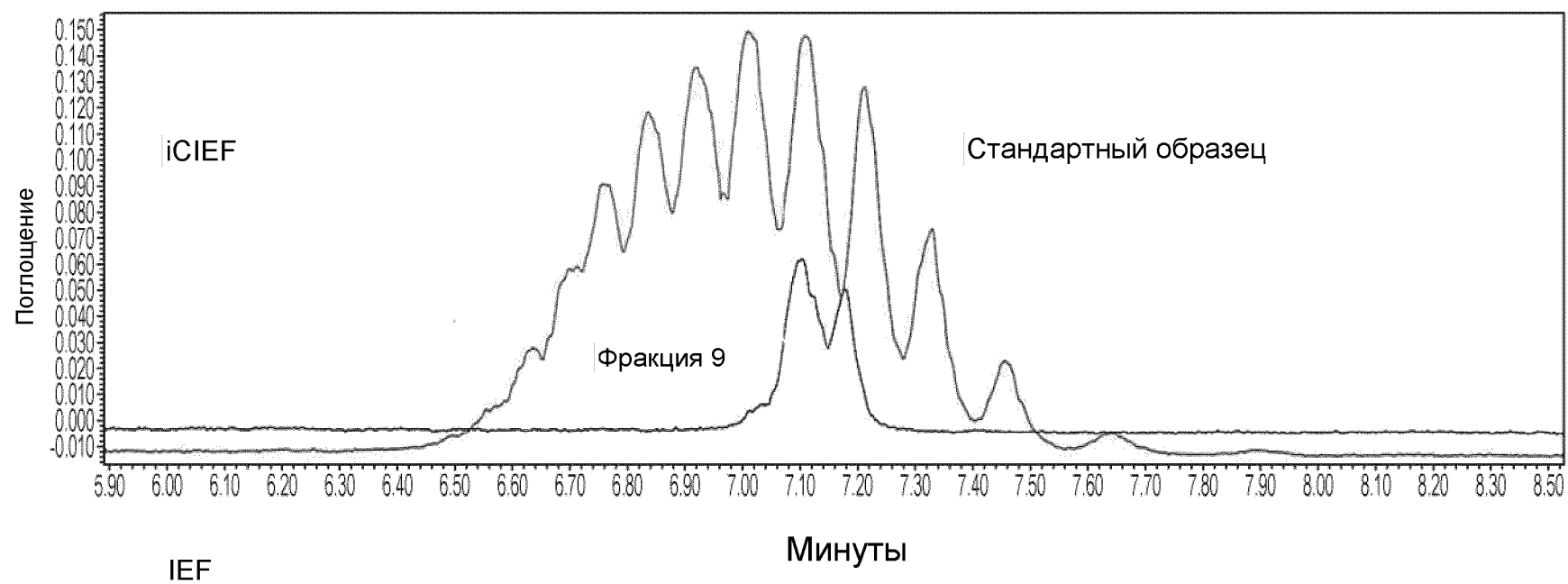
Фигура 4С



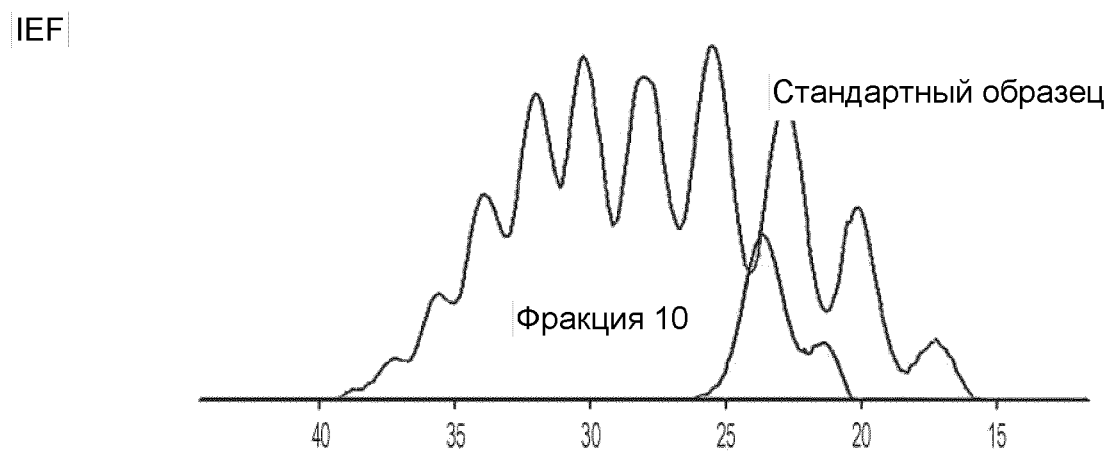
Фигура 4D



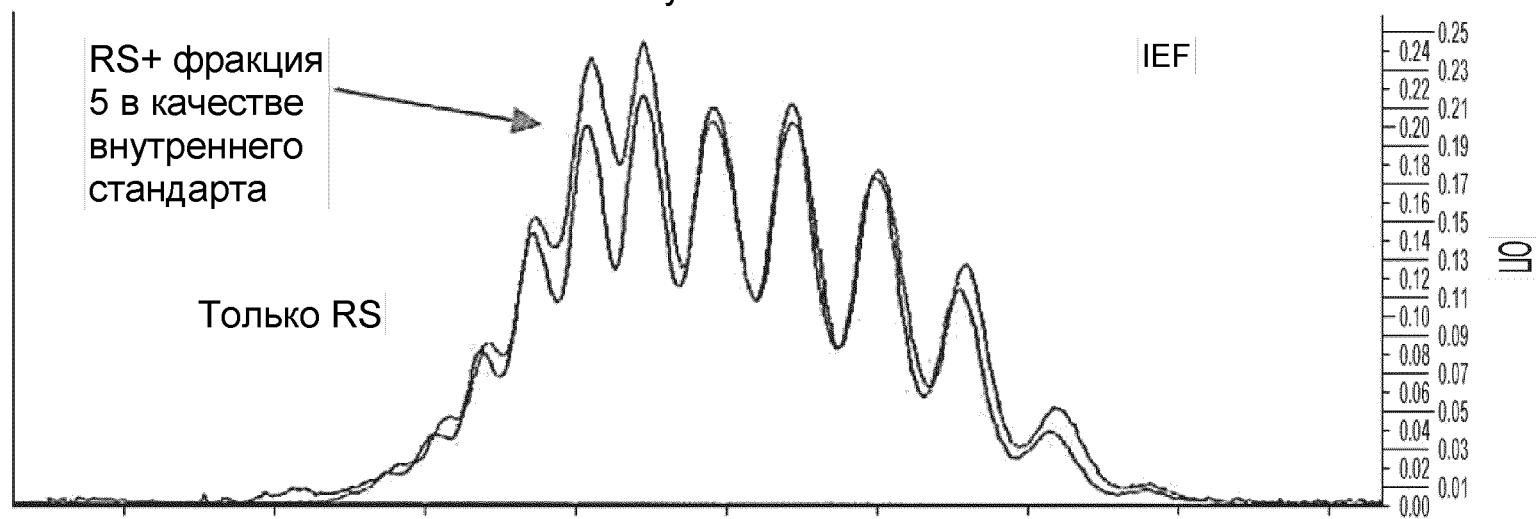
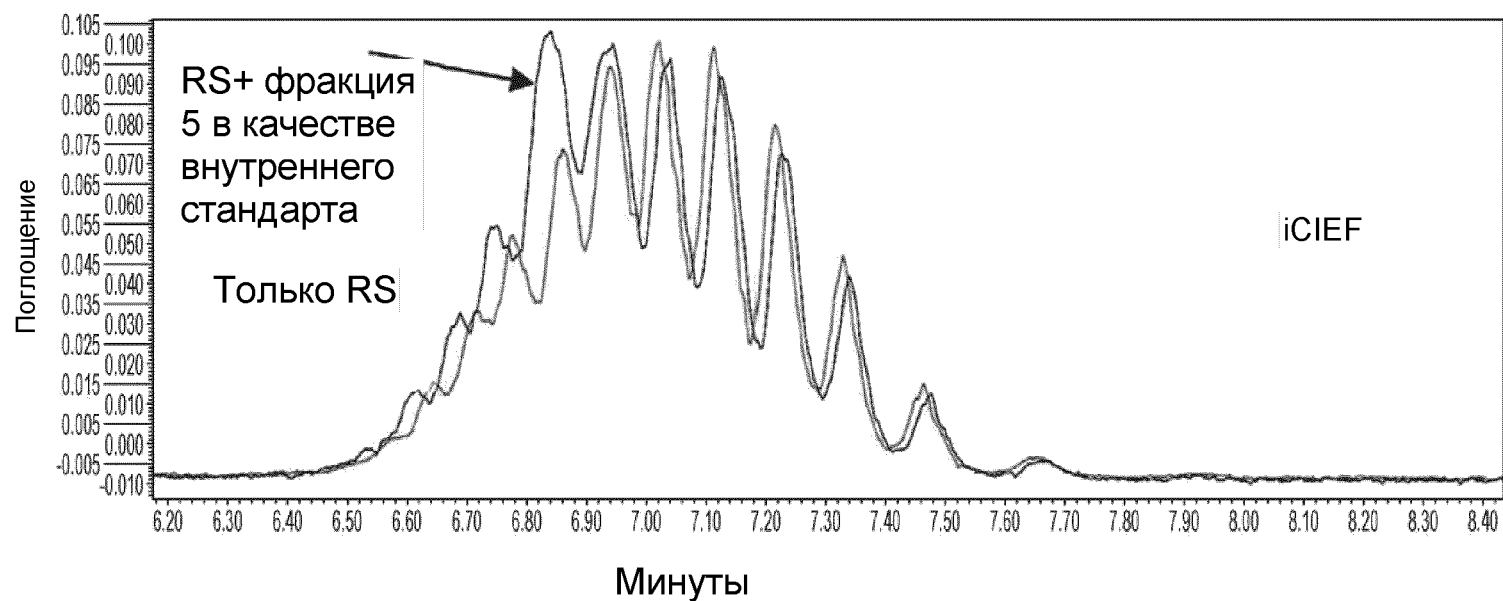
Фигура 4Е



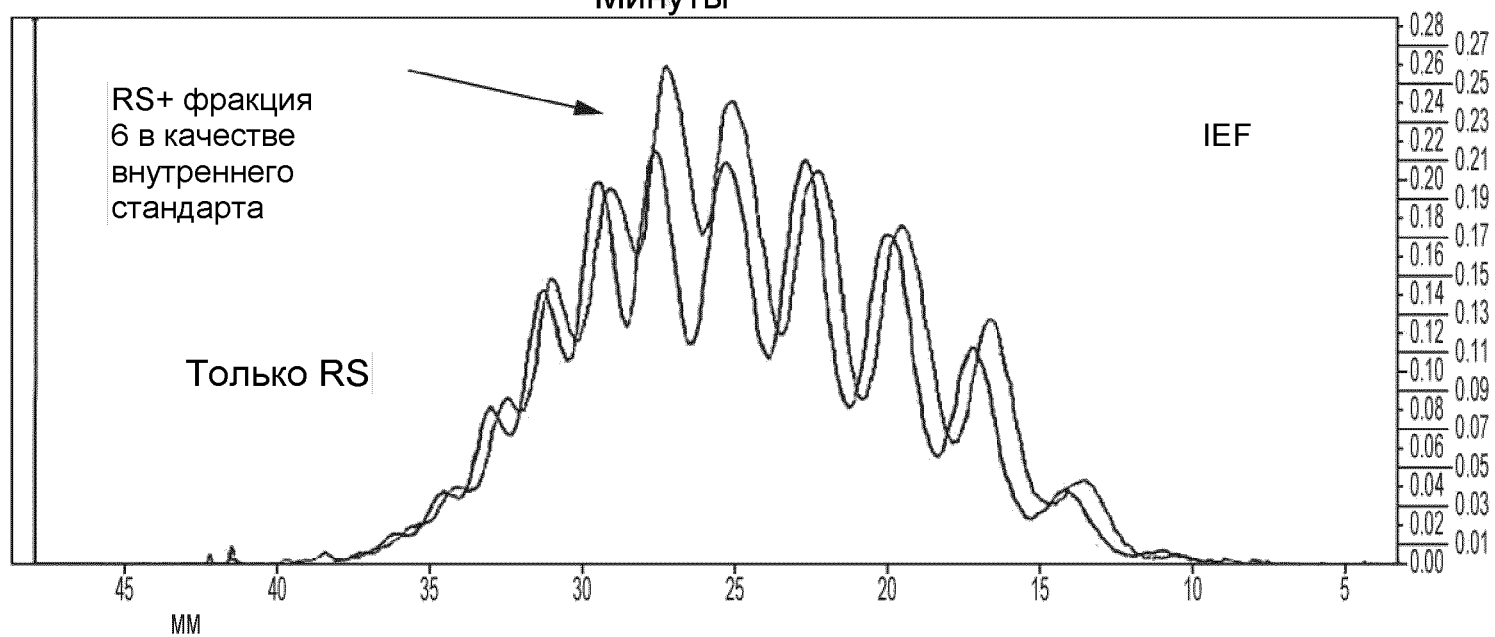
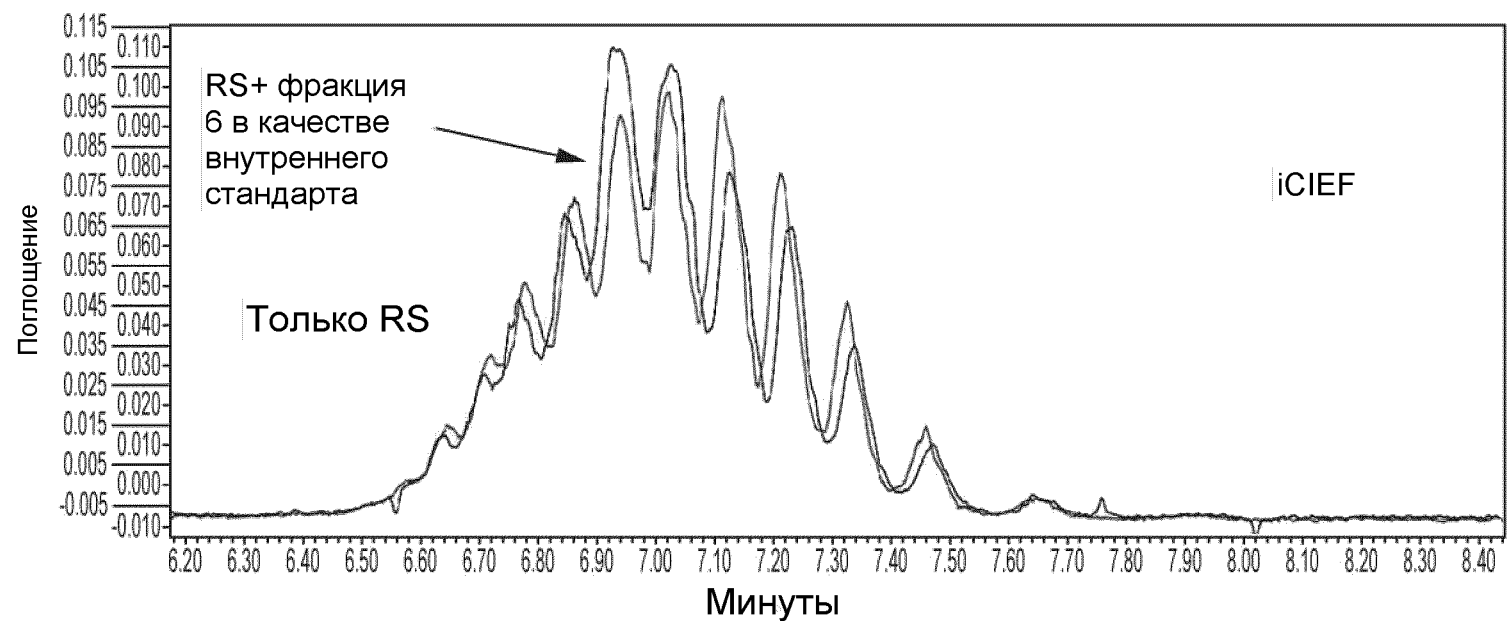
Фигура 4F



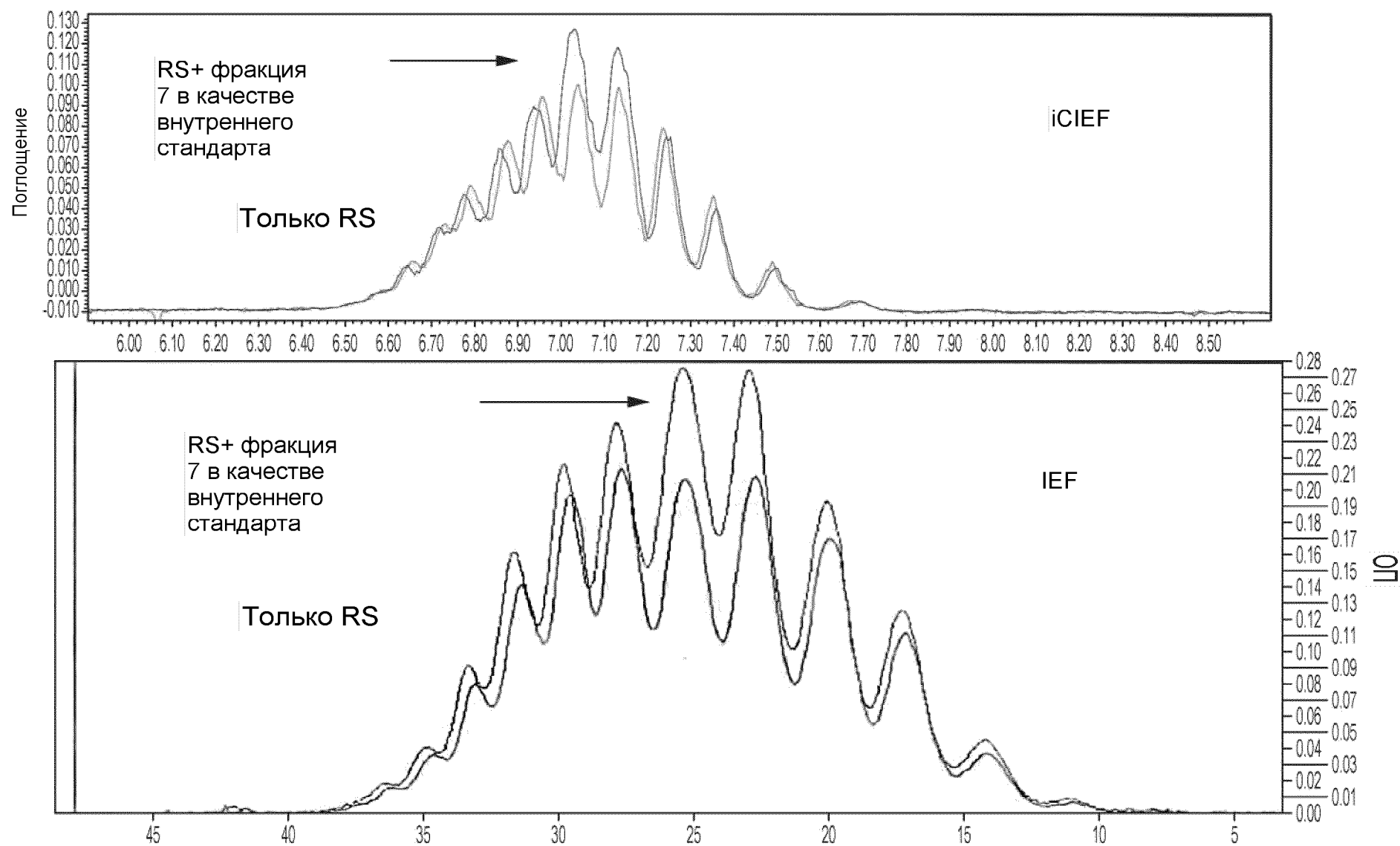
Фигура 4G



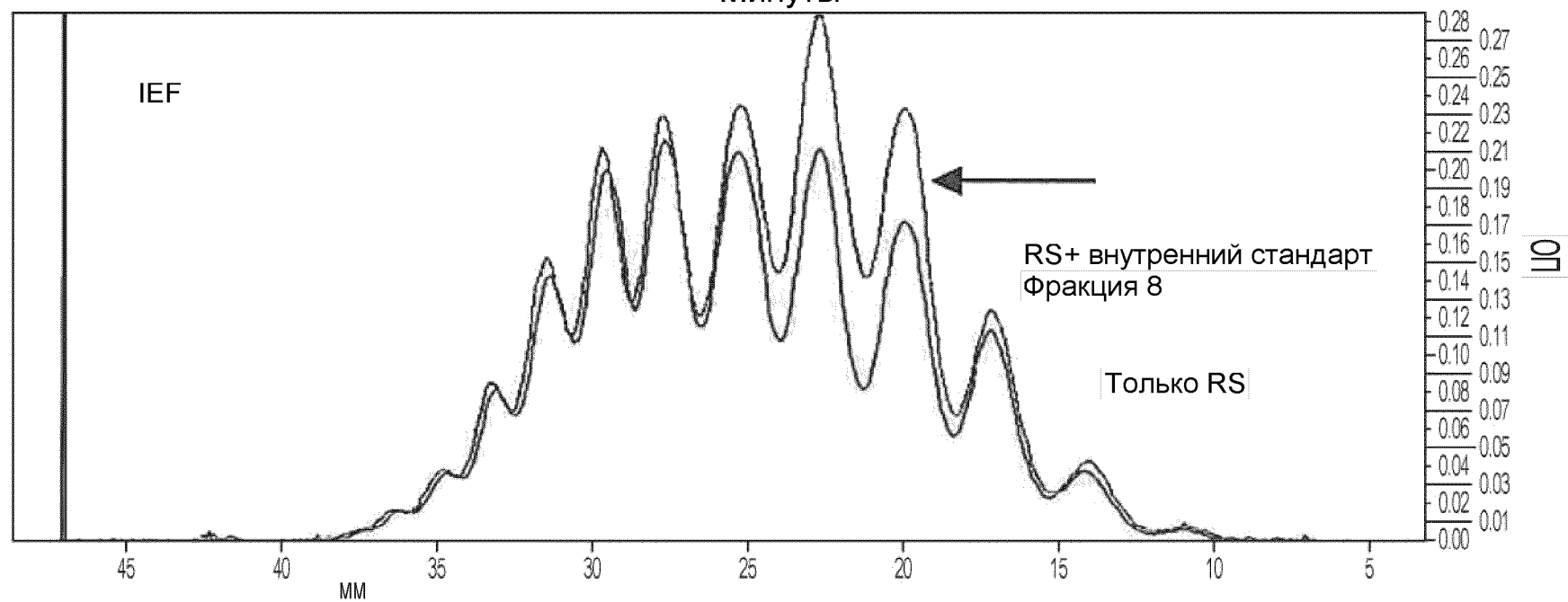
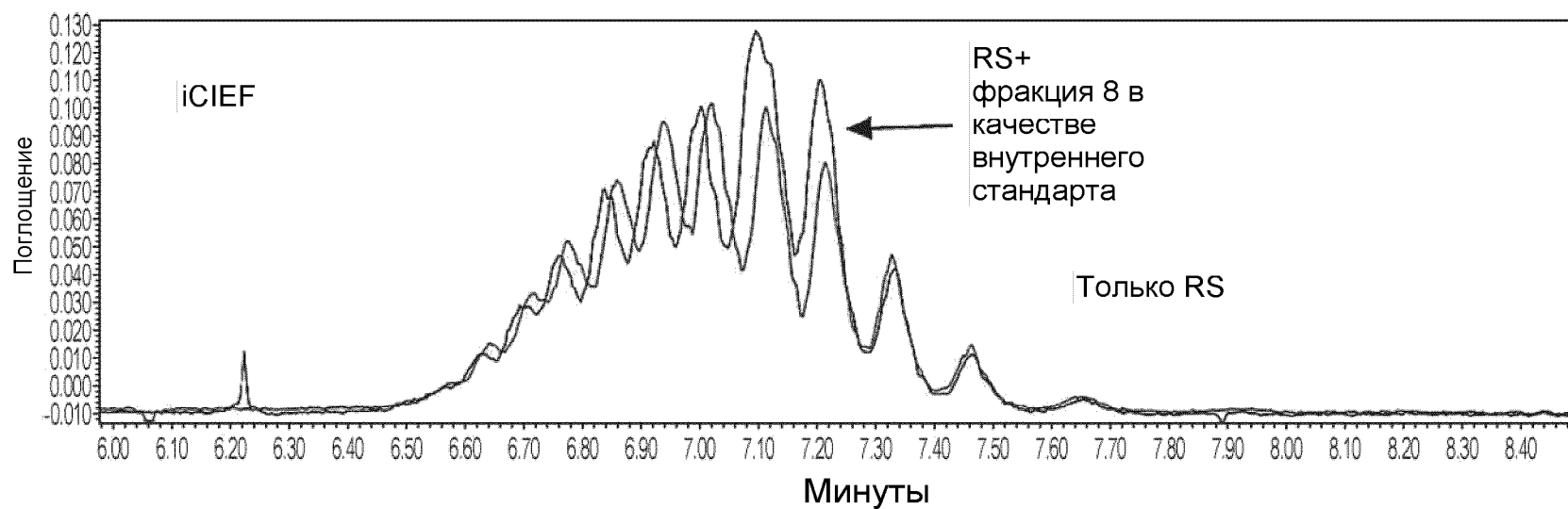
Фигура 5А



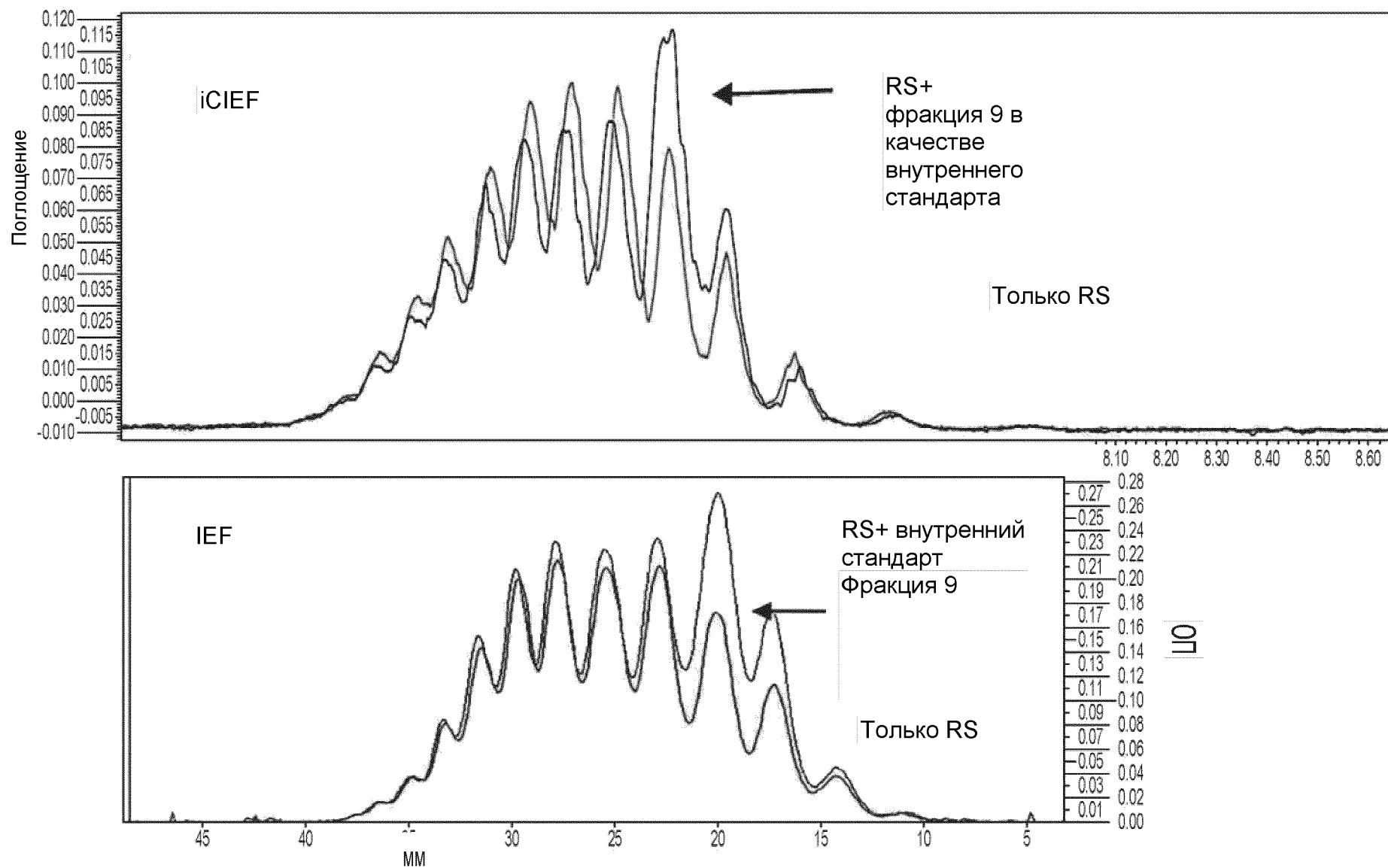
Фигура 5В



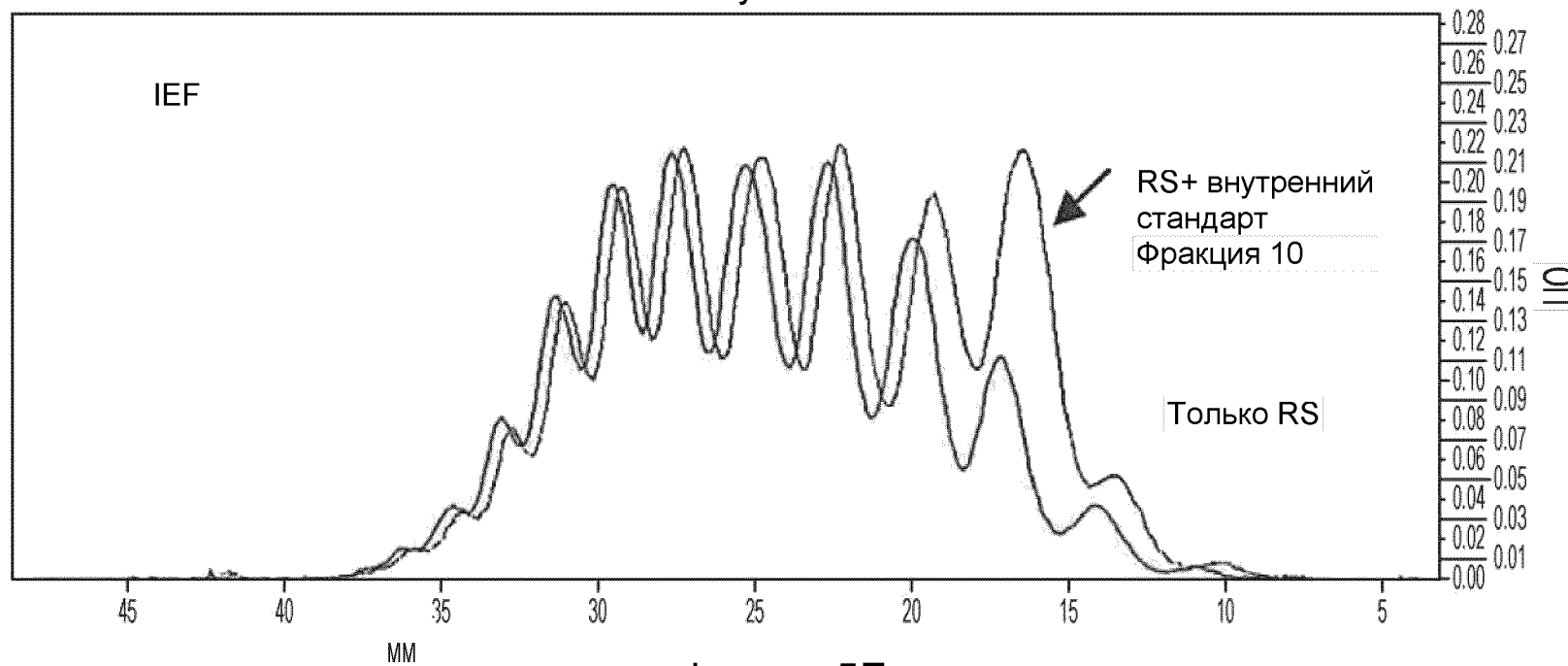
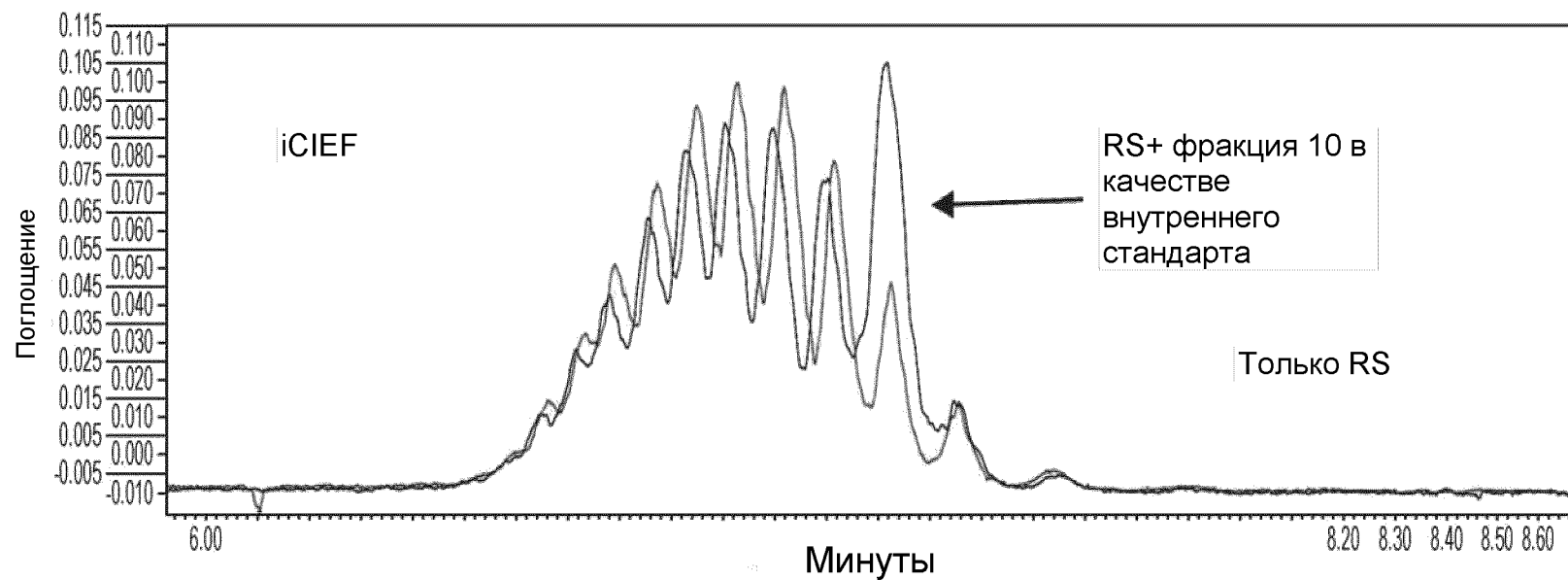
Фигура 5С



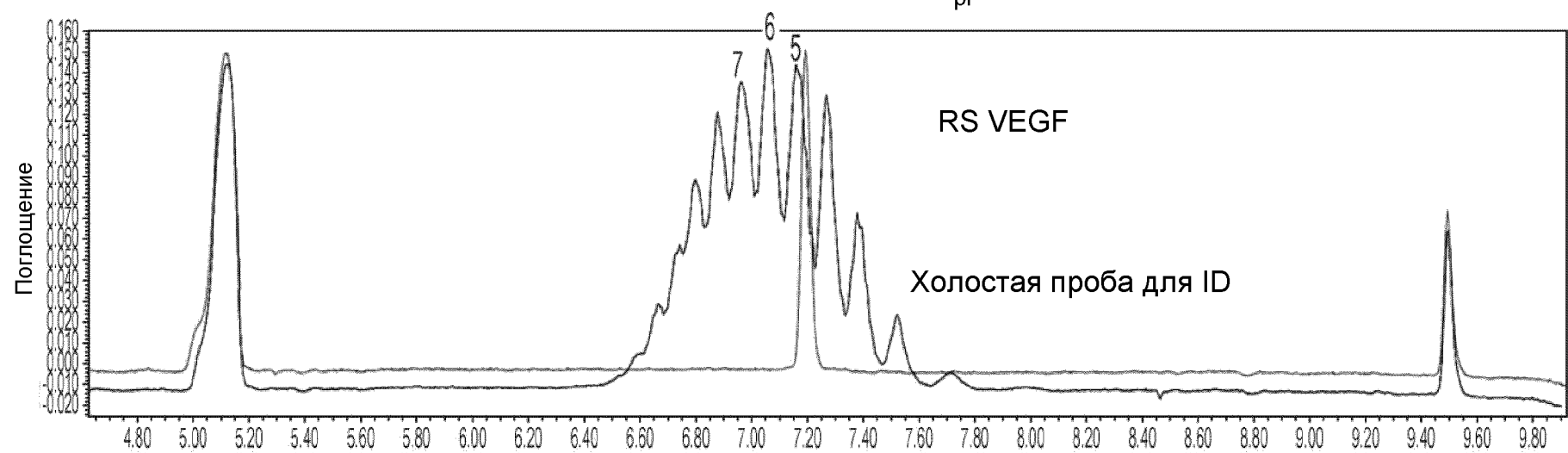
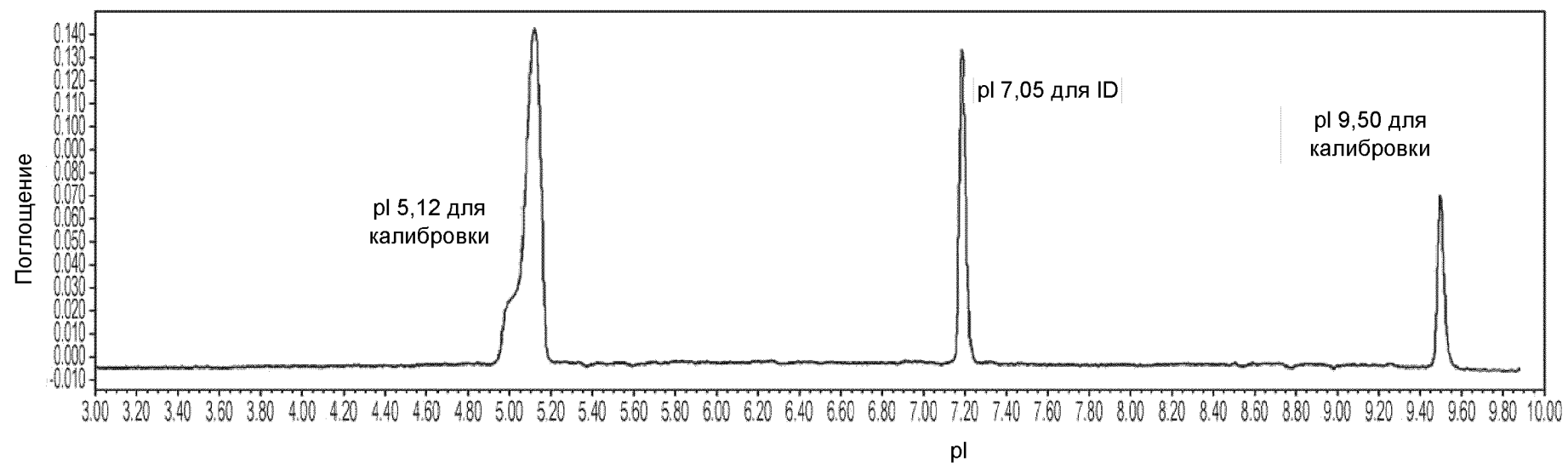
Фигура 5D



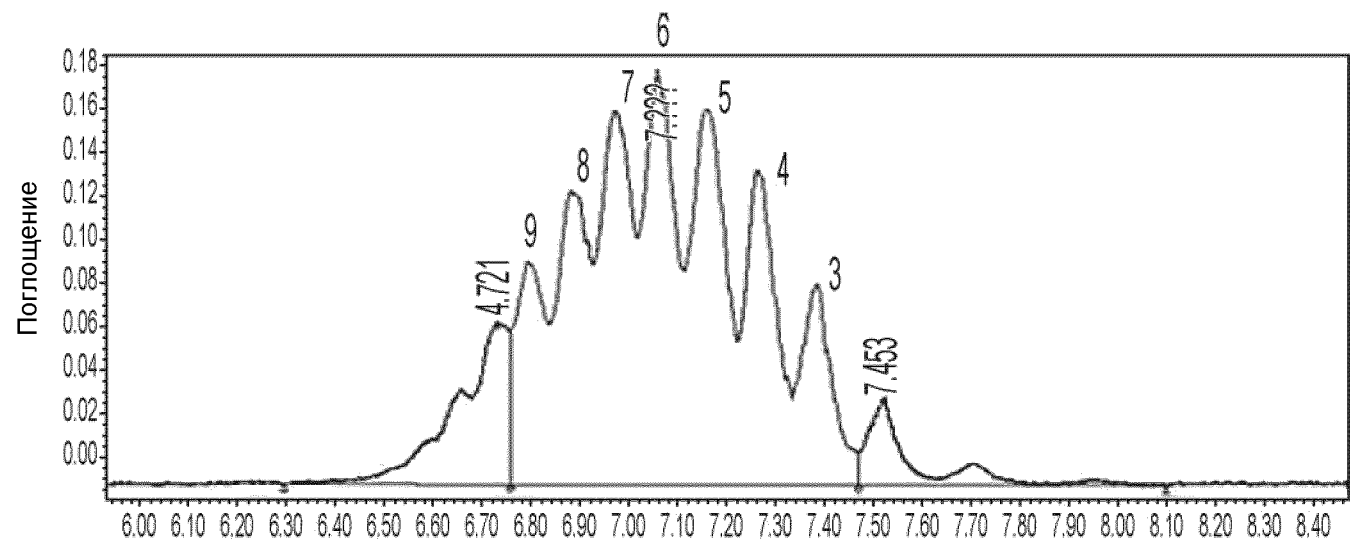
Фигура 5Е



Фигура 5F

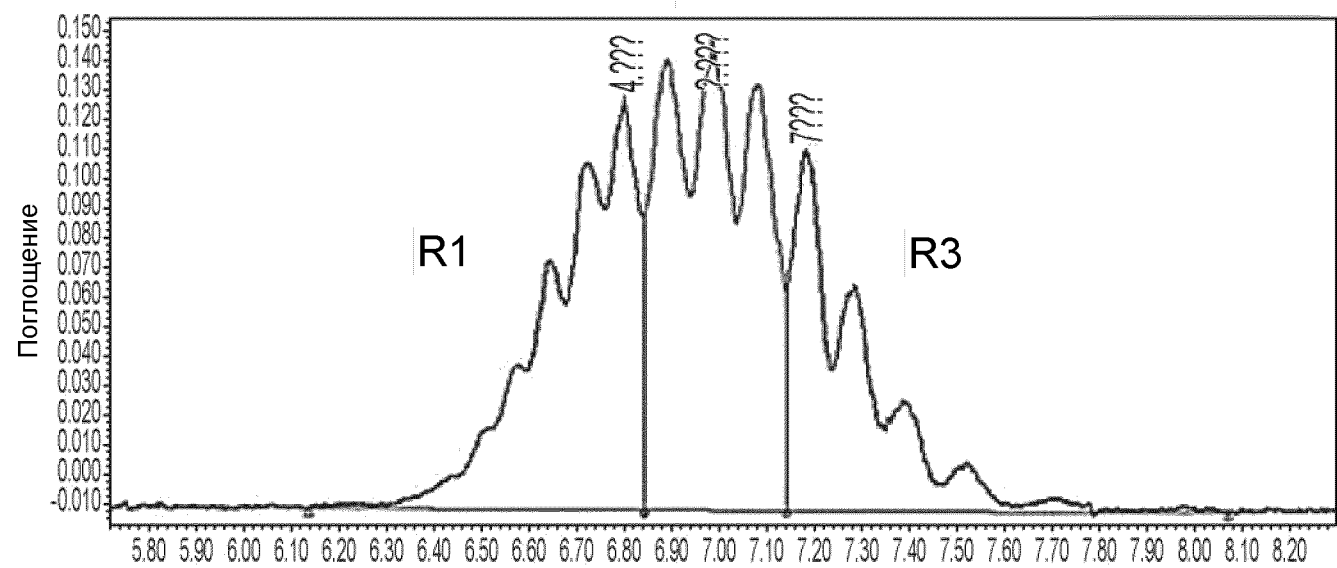


Фигура 6



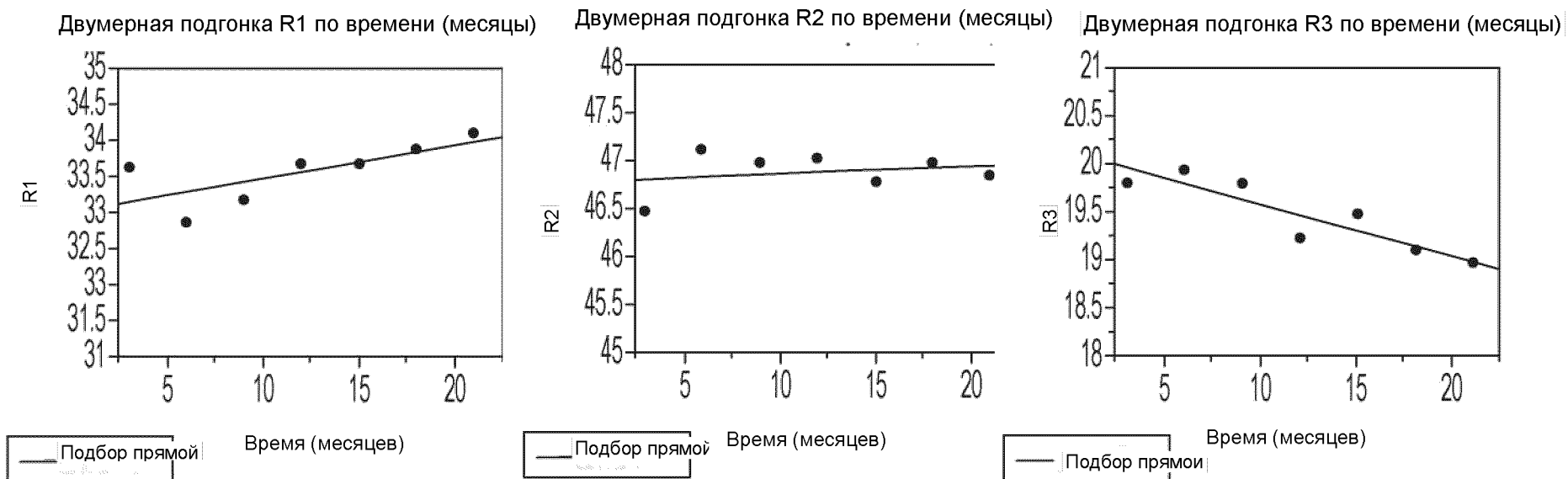
IEF

R2

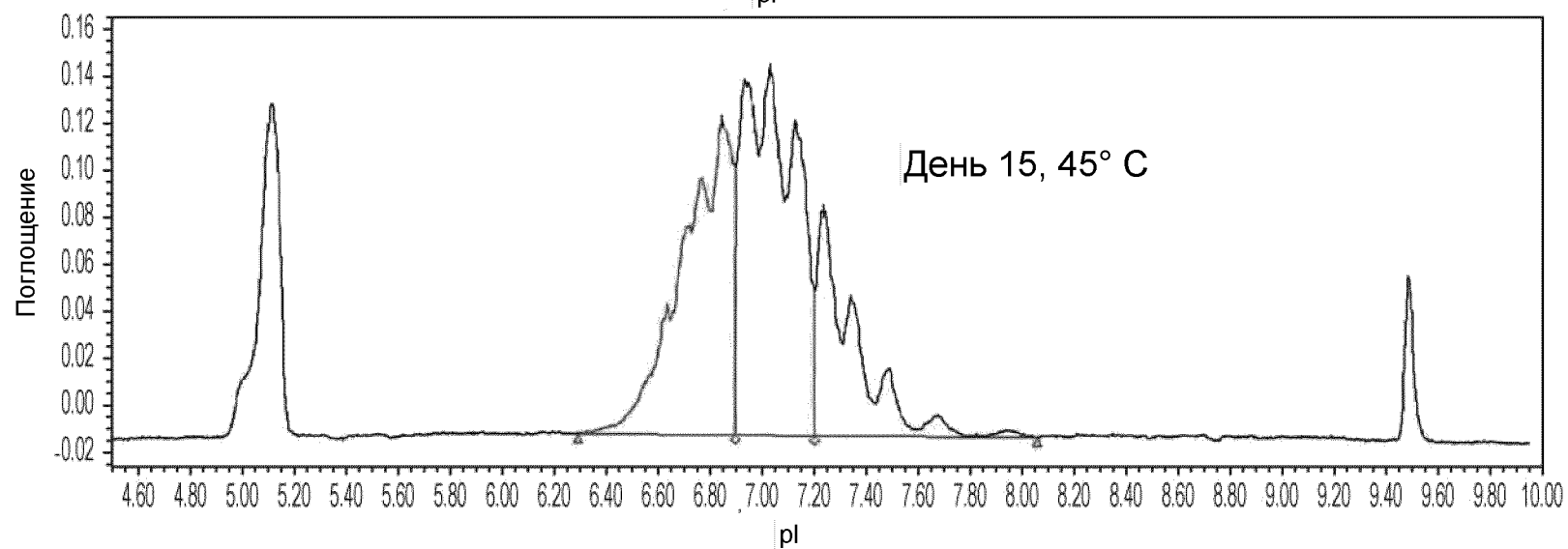
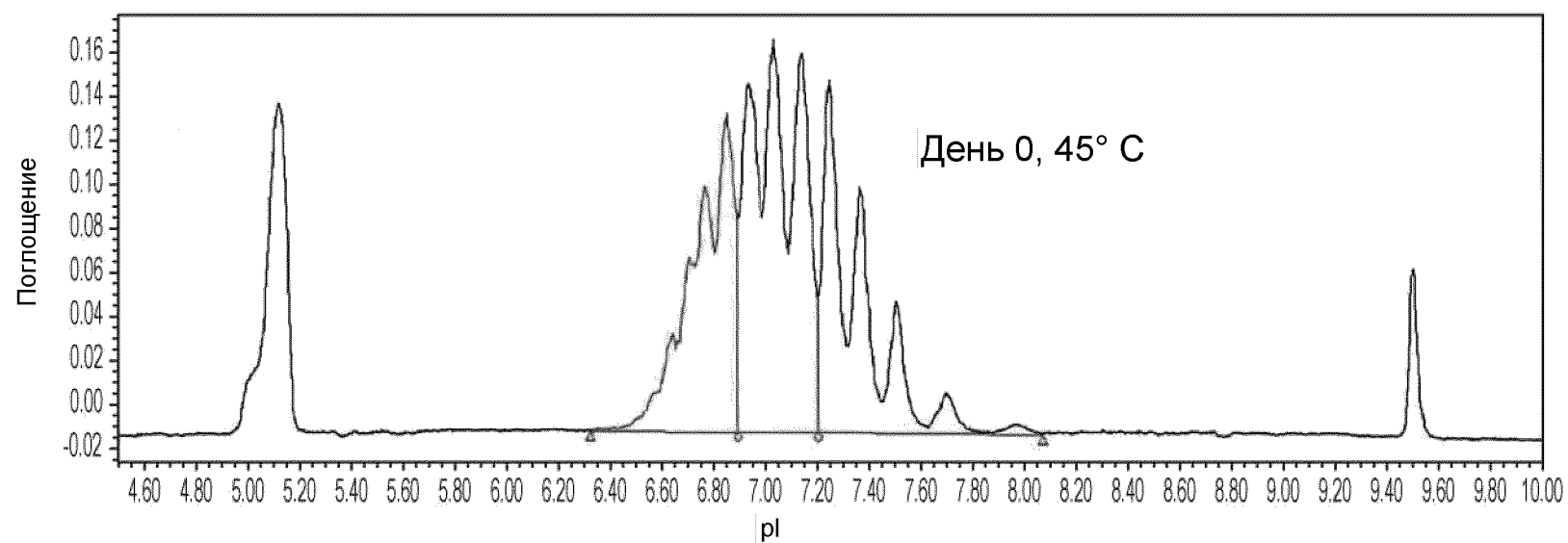


ICIEF

Фигура 7В

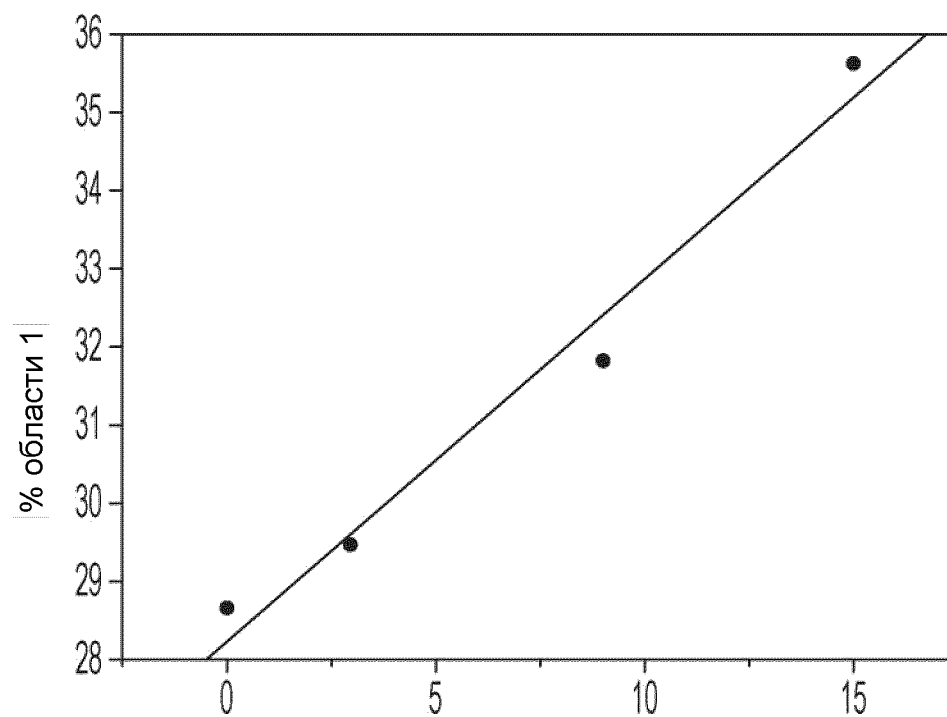


Фигура 8



Фигура 9

Двумерная подгонка % области 1 по временной точке



Момент времени

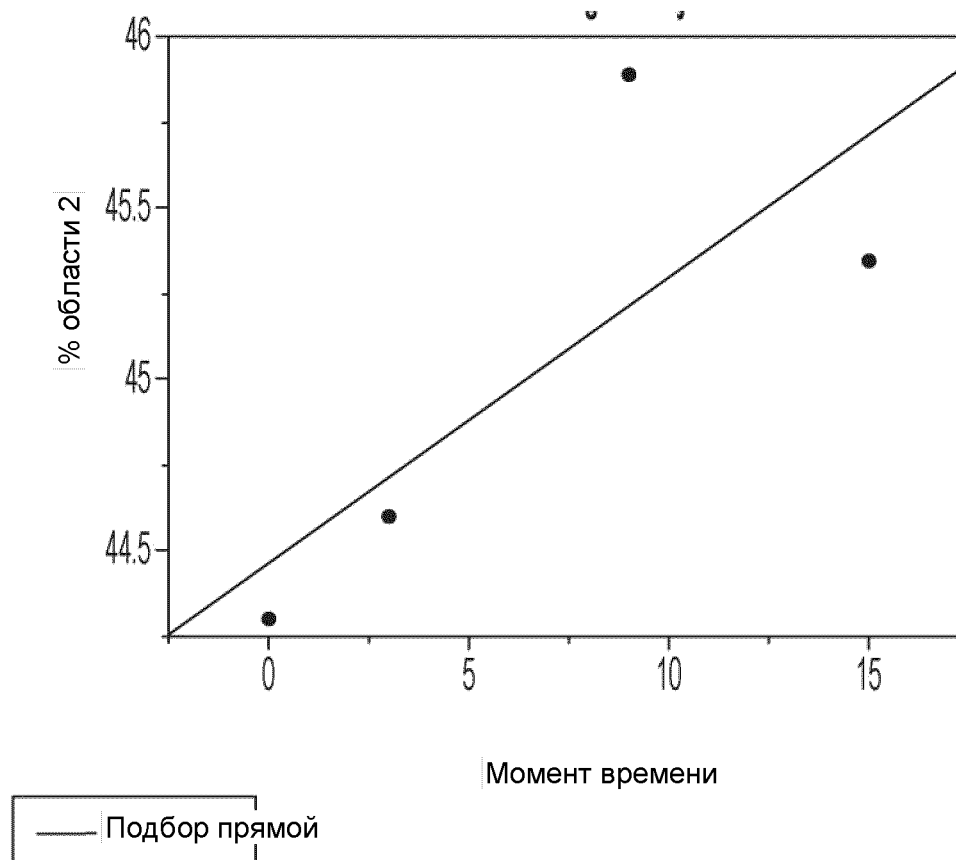
Подбор прямой

Подбор прямой

$\% \text{ область } 1 = 28,262034 + 0,4652542 \cdot \text{Временная точка}$

Фигура 10А

Двумерная подгонка % области 2 по временной точке

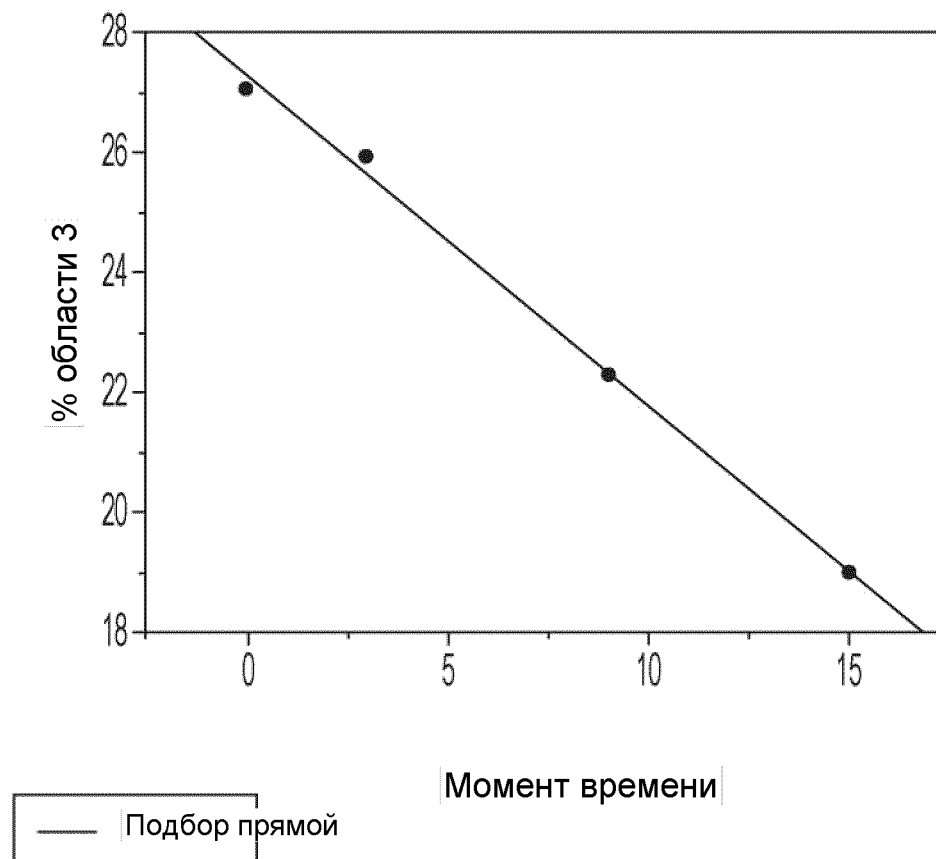


Подбор прямой

$$\% \text{ область 2} = 44,469831 + 0,0837288 \cdot \text{Временная точка}$$

Фигура 10В

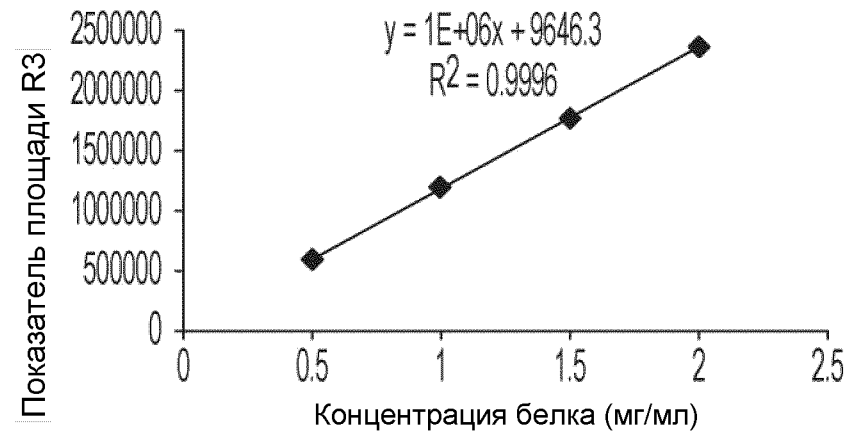
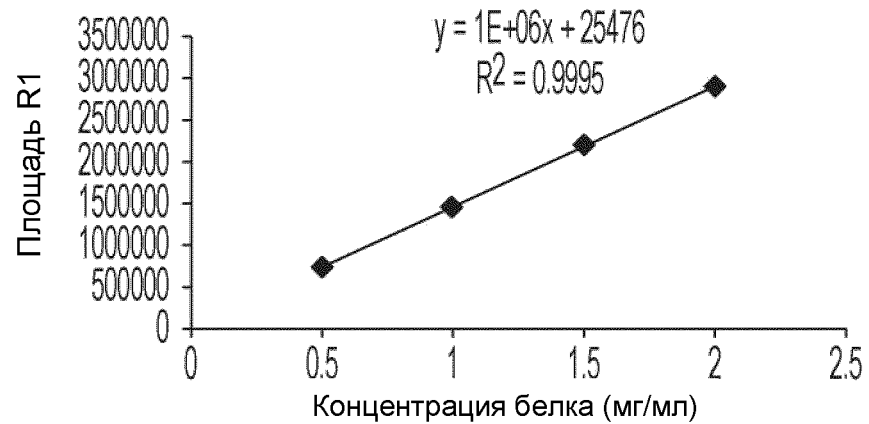
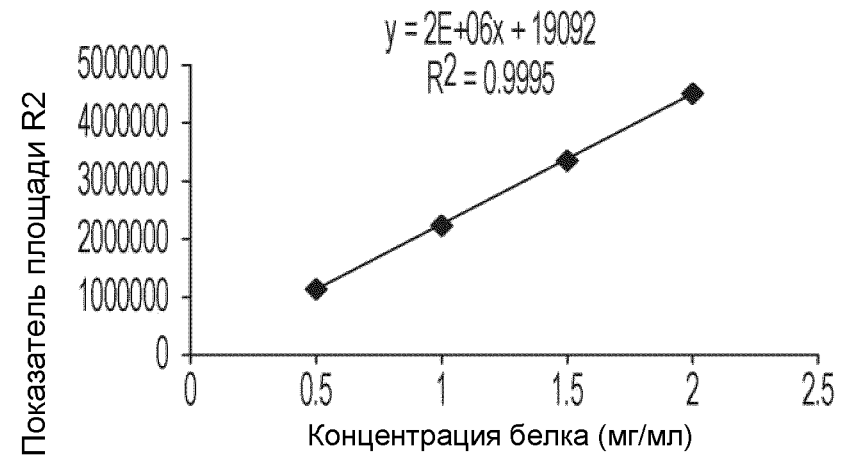
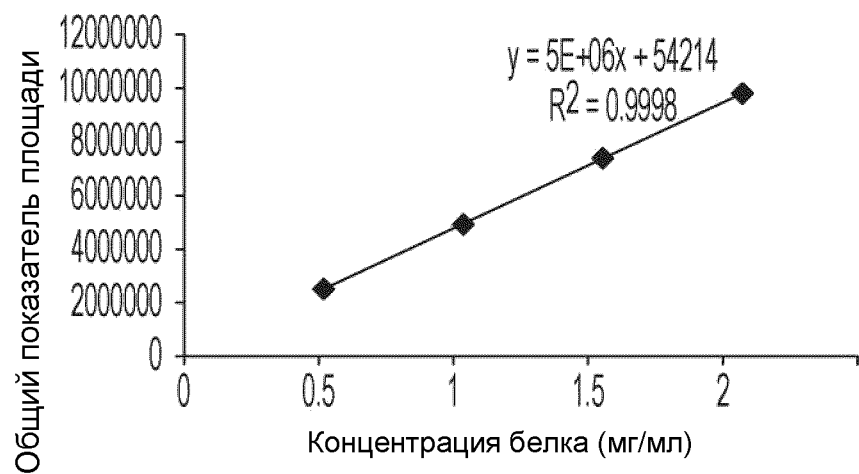
Двумерная подгонка % области 3 по временной точке



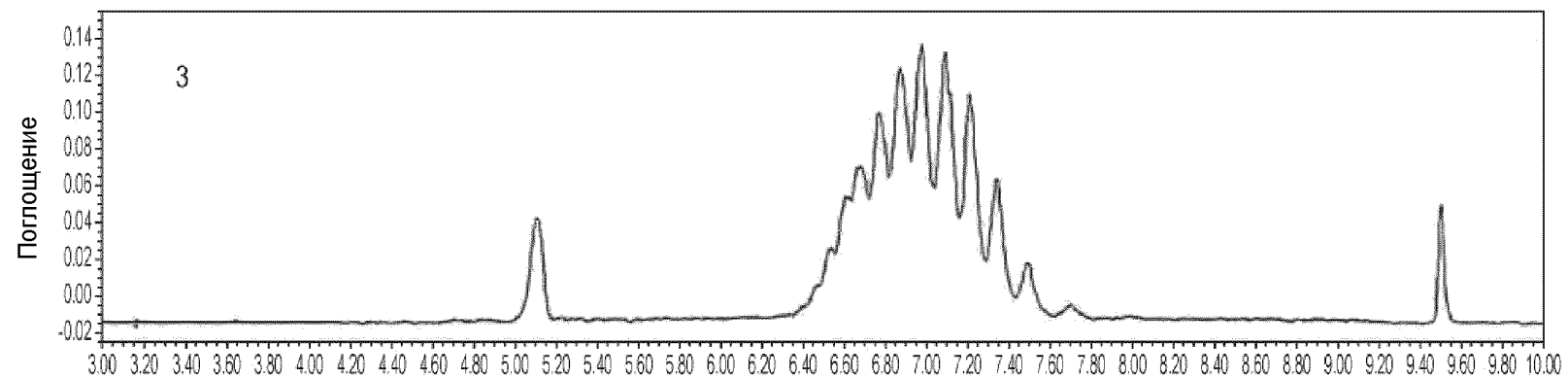
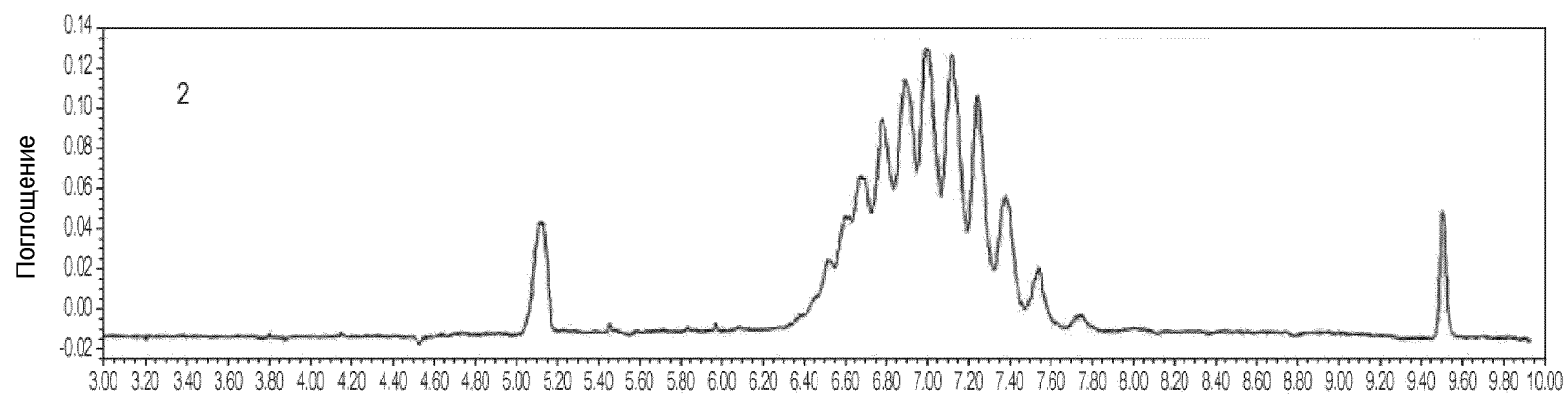
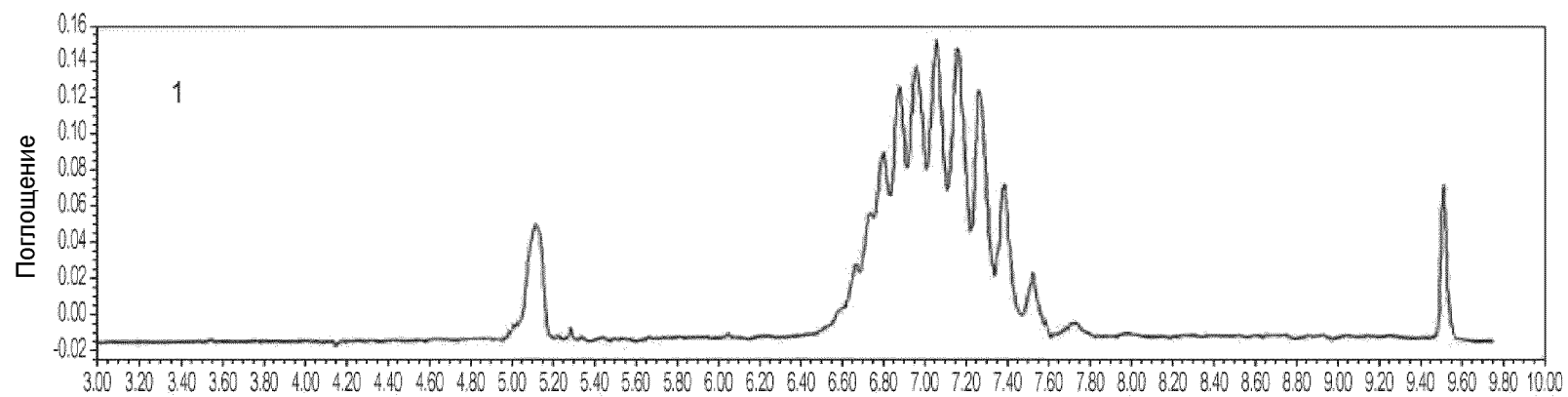
Подбор прямой

$$\% \text{ область } 3 = 27,269492 + 0,5488136 \cdot \text{Временная точка}$$

Фигура 10С

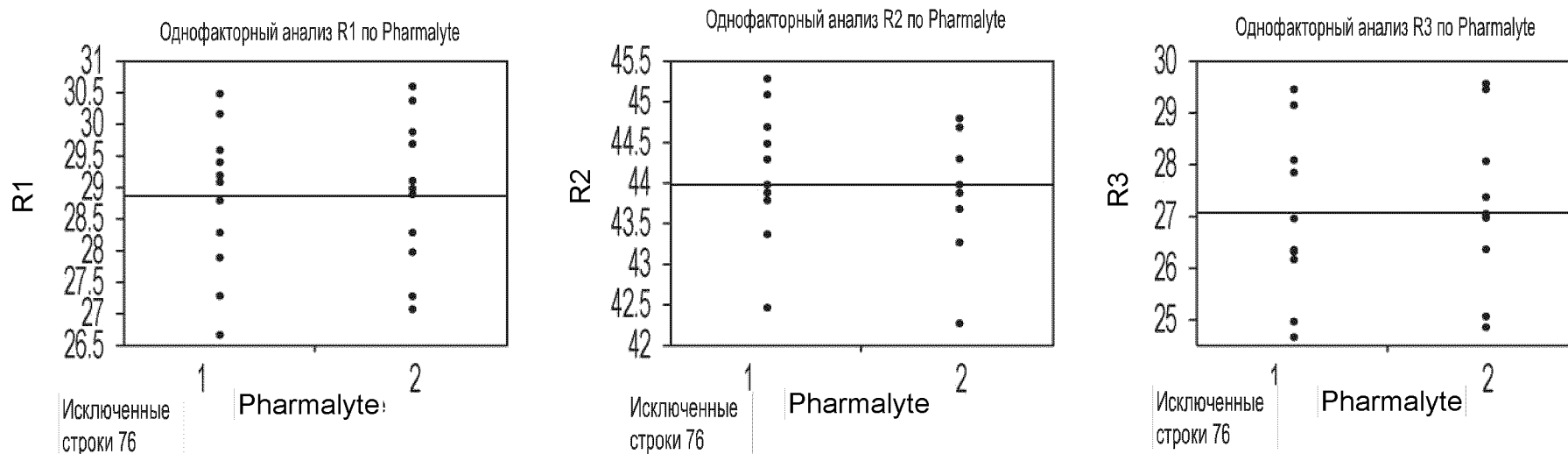


Фигура 11

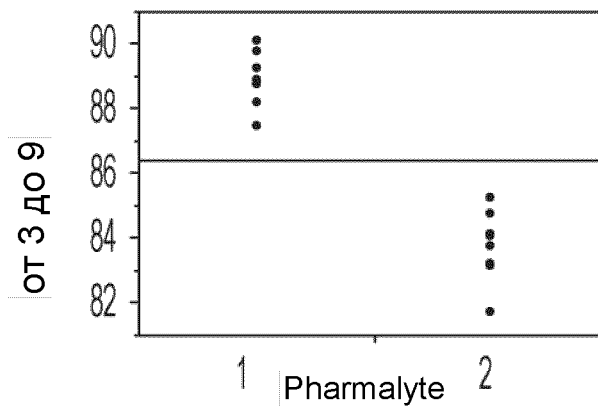


Фигура 12

Однофакторный анализ DS VEGF Trap по образцам Pharmalyte на основе % R1, %R2 и %R3

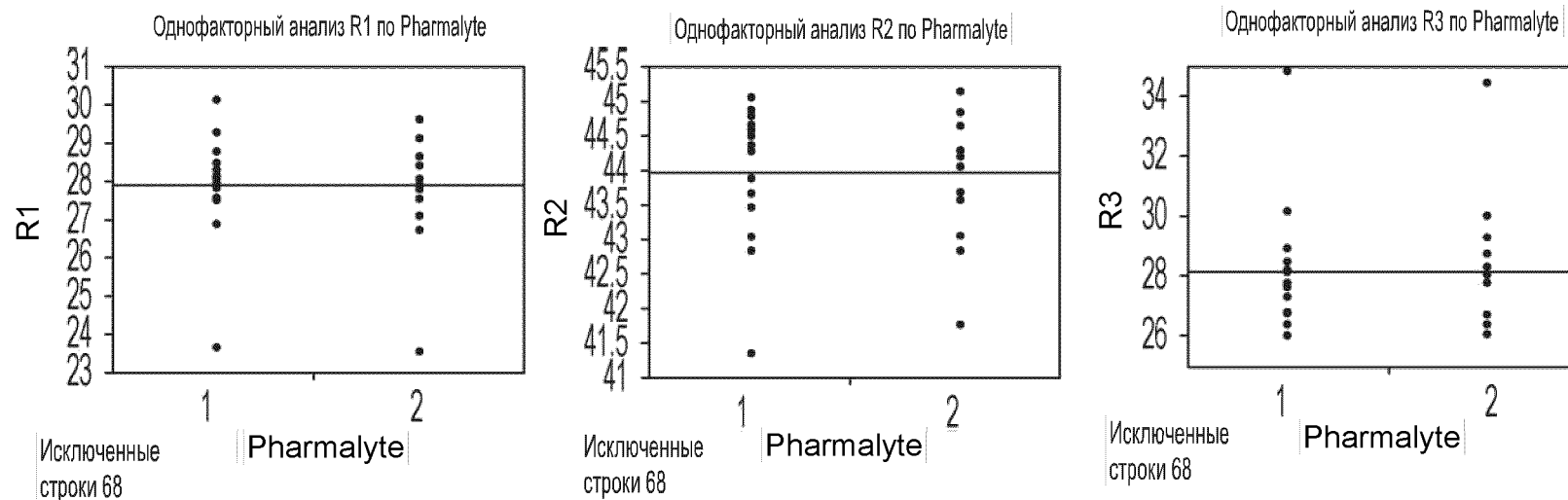


Однофакторный анализ DS VEGF Trap по образцам Pharmalyte на основе % площади пика 3-9

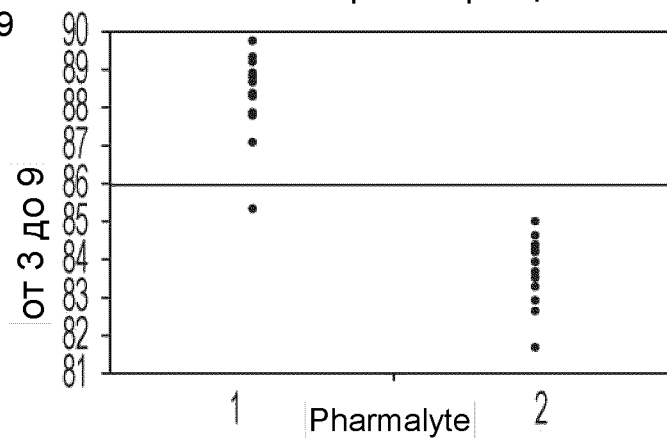


Фигура 13А

Однофакторный анализ DSI VEGF Трап по образцам Pharmalyte на основе % R1, %R2 и %R3

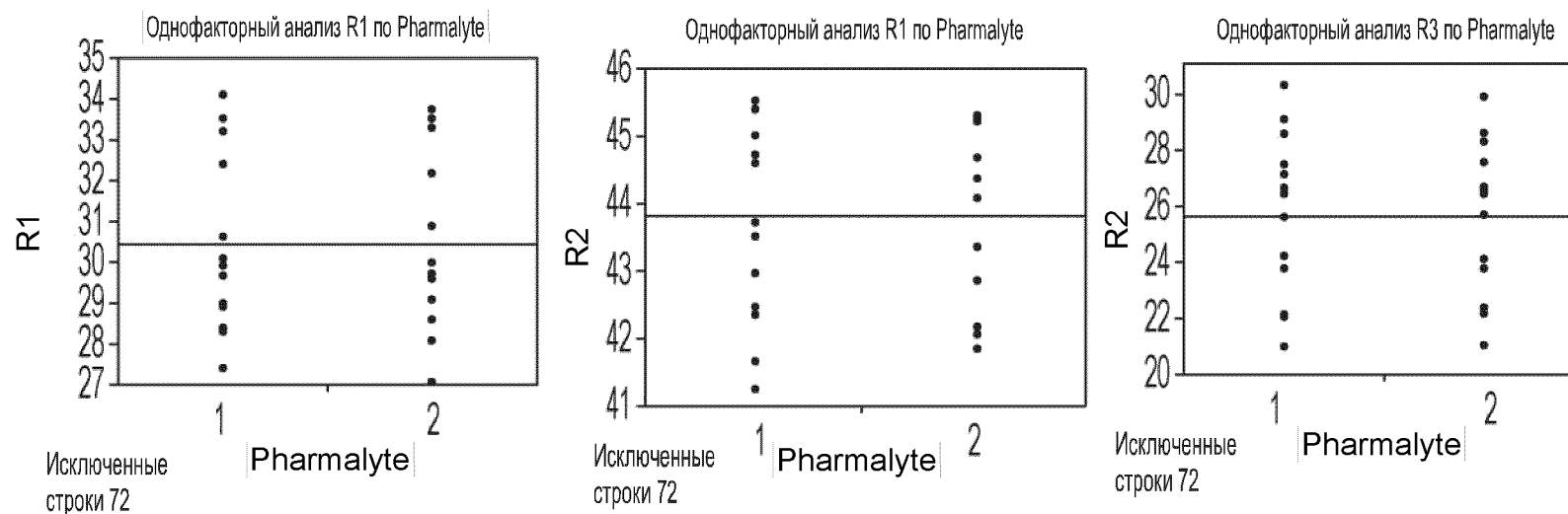


Однофакторный анализ DSI VEGF Трап по образцам Pharmalyte на основе % площади пика 3-9

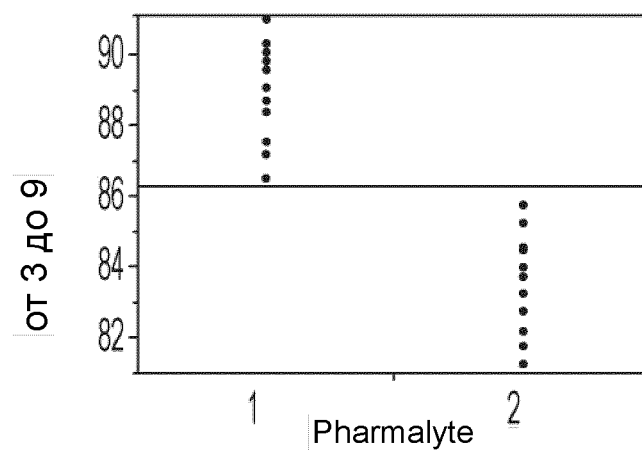


Фигура 13В

Однофакторный анализ DSI VEGF Trap по образцам Pharmalyte на основе % R1, %R2 и %R3

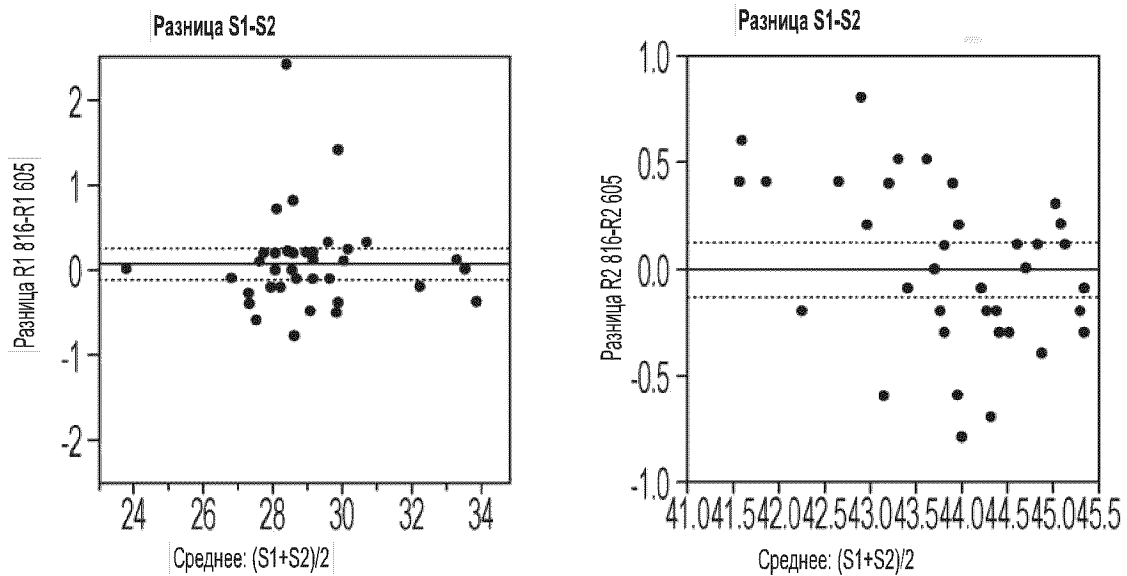


Однофакторный анализ DSI VEGF Trap по образцам Pharmalyte на основе % площади пика 3-9

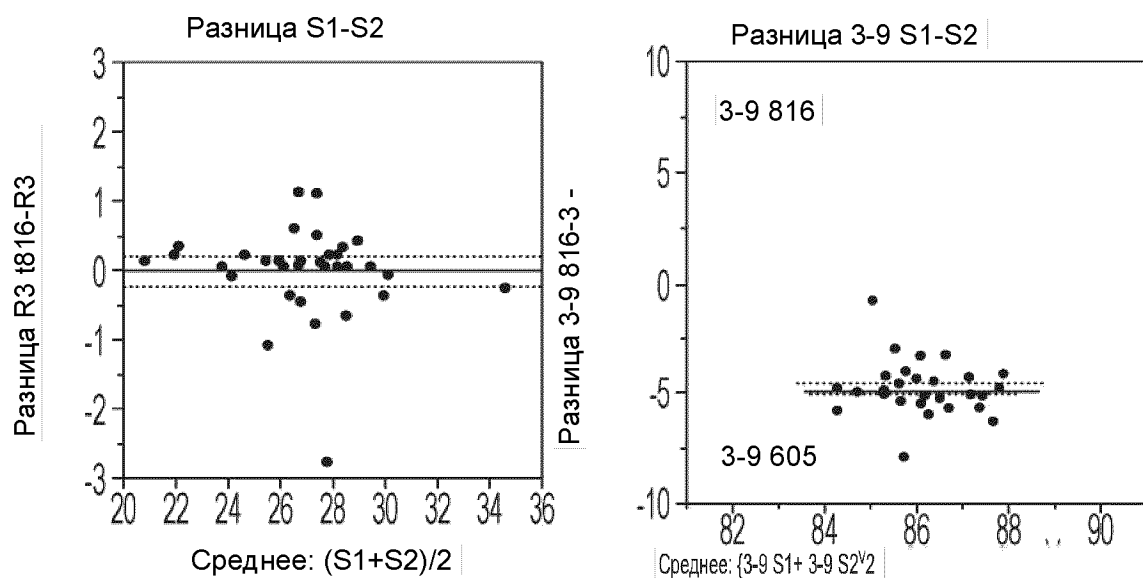


Фигура 13С

Согласованные пары



S1	29,1243	t-коэффиц.	0,758337	S1	43,9189	t-коэффиц.	-0,0433
S2	29,0541			S2	43,9216		
Средняя разница	0,07027	Разн.	36	Средняя разница	-0,0027	Разн.	36
Стд. ошибка	0,09266	Вероятн. > t	0,4532	Стд. ошибка	0,06242	Вероятн. > t	0,9657
Верхние 95%	0,2582	Вероятн. > t	0,2266	Верхние 95%	0,12389	Вероятн. > t	0,5271
Нижние 95%	-0,1177	Вероятн. < t	0,7734	Нижние 95%	-0,1293	Вероятн. < t	0,4829
N	37			N	37		
Корреляция	0,95901			Корреляция	0,94393		



S1	26,9784	t-коэффиц.	-0,39005	3-9 816	83,7757	t-коэффициент -	26.2059
S2	27,0189			3-9 605	88,6324	DF	36
Средняя разница	-0,0405	Разн.	36	Средняя разница	-4,8568	Вероятн. > t	<0,0001*
Стд. ошибка	0,10394	Вероятн. > t	0,6988	Стд. ошибка	0,18533	Вероятн. > t	1,0000
Верхние 95%	0,17025	Вероятн. > t	0,6506	Верхние 95%	-4,4809	Вероятн. < t	<0,0011*
Нижние 95%	-0,2513	Вероятн. < t	0,3494	Нижние 95%	-5,2326		
N	37			N	37		
Корреляция	0,96779			Корреляция	0,45242		

Фигура 13D