

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041923**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.15

(21) Номер заявки
202090515

(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**

(43) **2020.05.26**

(86) **PCT/US2018/046893**

(87) **WO 2019/036604 2019.02.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**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)

(56) **WO-2016070062
US-A1-20160144025**
SOSIC Z. et al.: Application of imaging
capillary IEF for characterization and quantitative
analysis of recombinant protein charge heterogeneity.
Electrophoresis. November 2008, Vol. 29, No. 21;
pages 4368-4376; page 4369, 1st column, 4th
paragraph; DOI: 10.1002/elps.200800157

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

B1**041923****041923****B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

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

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

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

Уровень техники

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

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.

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.

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).

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 концентрации образца.

Агрегация и осаждение белка в пределах капилляра наносит ущерб воспроизводимости электрофо-

реграммы. С этой целью могут использоваться добавки, такие как мочевины, чтобы помочь стабилизировать и солилизировать белок, поскольку он находится в фокусе.

Соответственно в некоторых вариантах осуществления предлагается способ анализа отличающихся зарядом вариантов сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF-Trar, 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 pH в пределах капилляра, прикладывание второго напряжения в течение второго заранее определенного периода времени для фокусирования миграции отличающихся зарядом вариантов белка к их соответствующей pI и детектирование, и количественное определение отличающихся зарядом вариантов белка.

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.

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).

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 мин;

второе напряжение составляет 3000 В;

второе заранее определенное время составляет приблизительно 7 мин;

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 до около 3000 В или находится в любом промежуточном интервале;

первое заранее определенное время составляет от приблизительно 1 с до приблизительно 5 мин или находится в любом промежуточном интервале;

второе напряжение составляет от около 1 до приблизительно 3000 В или находится в любом промежуточном интервале; и/или

второе заранее определенное время составляет от приблизительно 1 до приблизительно 14 мин или находится в любом промежуточном интервале.

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

В некоторых вариантах осуществления предлагается набор iCIEF, сконфигурированный для применения в анализе отличающихся зарядом вариантов VEGF-Trar, 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

Фиг. 1A-1F изображают электрофореграммы VEGF Trar с использованием разных амфолитов. На фиг. 1A, амфолит представляет собой Pharmalyte™, имеющий pI, которая находится в диапазоне 3-10; на фиг. 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 фиг. 1C амфолит представляет

собой Servalyt™, имеющий pI, которая находится в диапазоне 2-9; на фиг. 1D амфолит представляет собой Servalyt™, имеющий pI, которая находится в диапазоне 4-9; на фиг. 1E амфолит представляет собой Biolyte™, имеющий pI, которая находится в диапазоне 3-10; и на фиг. 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.

На фиг. 2A-2E показано сравнение электрофорограмм VEGF Trap при различных концентрациях мочевины.

На фиг. 3 показано сравнение электрофорограммы VEGF Trap, полученной с применением способов изоэлектрического фокусирования и капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре.

Фиг. 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.

Фиг. 5A-5F иллюстрируют электрофореграммы RS VEGF Trap с фракциями OFFGEL VEGF Trap в качестве внутреннего стандарта (фракции № 5-10), проанализированные на фиг. 4A-4G.

На фиг. 6 показано сравнение электрофорограммы холостой пробы и VEGF Trap с независимым маркером в качестве внутреннего стандарта.

Фиг. 7A иллюстрирует электрофорограмму капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре образца RS VEGF Trap с обозначенными областями 1, 2 и 3.

Фиг. 7B иллюстрирует различие в выдаче результатов электрофорограммы между способом изоэлектрического фокусирования и способом капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре.

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

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

Фиг. 10A-10C иллюстрируют статистический анализ данных капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре, предлагаемых на фиг. 9.

Фиг. 11 представляет данные, относящиеся к линейности способа капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре.

На фиг. 12 показано сравнение электрофорограмм капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре трех образцов амфолита.

Фиг. 13A-13D иллюстрируют статистический анализ данных капиллярного изоэлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре, полученных из исторических образцов VEGF Trap.

Подробное описание изобретения

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 табл. 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 анализирования 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	SDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSPTNITVLK KFPLDITLIPDGKRIIWDNRKGFHSNATYKEIGLLTCEATVN GHLYKTNLYLTHRQNTIHDVVLSPSHGIELSVGEKLVLC TARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEM KKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRV HEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFLYSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	1

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.

Способы анализируемых отличающихся зарядом вариантов VEGF Trap обычно включают загрузку образца белка в разделительный капилляр, который содержит смесь, по меньшей мере, амфолит-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.

В разделительный капилляр может быть загружен VEGF Trap в концентрации, которая находится в диапазоне от около 0,5 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.

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%.

Что касается первого напряжения, оно может находиться в диапазоне от приблизительно 1 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.

Второе напряжение также может находиться в диапазоне от приблизительно 1 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.

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

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

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.

Реагенты и оборудование

Табл. 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:

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 мочевины,
0,35% метилцеллюлозы,
1 мин предварительного фокусирования при 1500 В и
7 мин фокусирования при 3000 В.

Фиг. 1A-F иллюстрируют электроферограмму, полученную с применением шести диапазонов амфолитов с анализатором заряда iCE3. Используют следующие диапазоны амфолитов:

фиг. A - Pharmalyte 3-10,
фиг. B - комбинированный Pharmalyte 5-8/8-10,5,
фиг. C - Servalyt 2-9,
фиг. D - Servalyt 4-9,
фиг. E - Bio-Lyte 3-10, 40%,
фиг. F - 3-Blend 3-10 и Pharmalyte 6,7-7,7.

Выбранный белок

Амфолиты, которые находятся в диапазоне pI 3-10, выбирают в качестве общего профиля электроферограммы iCIEF, так как они наиболее близко напоминают электроферограмму из одобренной в настоящее время процедуры анализа отличающихся зарядом вариантов VEGF-Trap (смотри, например, изображение IEF показано на фиг. 3).

Оптимизация мочевины

Оптимизация способа, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, также включает изменение концентрации мочевины (от отсутствия мочевины до 8 М). Фиг. 2A-2E иллюстрируют влияние подобного изменения концентрации мочевины на электроферограмме 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.

Дополнительные эксперименты проводили с применением 2 М мочевины для оптимизации концентрации амфолита 3-10 и концентрации белка. Фиг. 3 иллюстрирует электроферограммы, полученные с применением 2 М мочевины, 0,35% метилцеллюлозы и 3% амфолита 3-10 при концентрации белка 1,0 мг/мл. Электроферограмму iCIEF сравнивали с другой электроферограммой и делали предварительное обозначение пиков (фиг. 3).

Характеристика метода

Профиль общего заряда и паттерн пиков, полученных с применением метода анализа iCIEF, были сопоставимы с профилем полосы IEF (как показано на фиг. 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:

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;

2) раствор VEGF Trap получают путем добавления 73 мкг VEGF (4,2 мг) к 12 мл исходного раствора и 3 мл воды;

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

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 (см., руководство пользователя OFFGEL: Agilent 3100 OFF GEL Fractionator Kit quick Start Guide, 5th Edition Sep 2010);

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;

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;

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.

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 (см. фиг. 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 (фиг. 5). Табл. 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
10	2,098	110
11*	1,235	94
12*	2,574	15

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. Фиг. 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 (фиг. 5A) до основных фракций (фиг. 5F).

Корреляция между паттерном полосы IEF на основе геля и паттерном пика iCIEF на основе капилляра была очевидна из анализа фракций OFFGEL. Из фиг. 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.

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).

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 фиг. 6 (верхняя панель), для калибровки используют ограничивающие маркеры pI 5,12 и pI 9,50 в мастер-микс. Нижняя панель на фиг. 5 иллюстрирует электрофорограмму iCIEF RS VEGF-Trar, наложенную на холостую пробу, содержащую маркер 7,05 в качестве внутреннего стандарта, который будут применять для идентификации Пика 5 в профиле образца iCIEF VEGF-Trar. 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-Trar (Пики 5, 6 и 7).

Вместо того, чтобы демонстрировать пики 3-9, как в методе IEF, метод iCief (в соответствии с некоторыми вариантами осуществления) демонстрируют гетерогенность заряда образца VEGF-Trar 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-Trar, 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 фиг. 7. Область 1 (кислая) в образце iCIEF VEGF-Trar указывается как группа пиков, которые являются относительно кислыми по сравнению с кластером из трех основных пиков (Пики 5, 6 и 7) на электрофорограмме VEGF-Trar. Область 3 (основная) в образце iCIEF VEGF-Trar указывается как группа пиков, которые являются относительно основными по сравнению с кластером из трех основных пиков (Пики 5, 6 и 7) на электрофорограмме VEGF-Trar.

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. Фиг. 7В 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 табл. 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-Trar, 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.

В табл. 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-Trar. 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 табл. 4 видно, что для образца VEGF-Trar, 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-Trar в анализе iCIEF, является точным отражением природы изменений, происходящих в образце VEGF-Trar, на основе его структуры и сложности паттерна заряда, обусловленной его различной степенью сиаирования. Увеличение кислотных вариантов (Область 1 - высокая степень сиаированных частиц) образца VEGF-Trar 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-Trar и оставляет мало места для контроля различных видов заряда, делая его не столь чувствительным, как способ детектирования незаметных изменений в гетерогенности заряда образца VEGF-Trar.

VEGF-Trar имеет десять сайтов гликозилирования. Цепи гликанов, прикрепленные к этим сайтам, являются разветвленными, а каждая ветвь может заканчиваться или не заканчиваться отрицательно заряженным сахарным мономером, сиаовой кислотой. Естественное изменение присутствия групп сиаовой кислоты на концах гликановых цепей приводит к ансамблю отличающихся зарядом вариантов

VEGF-Трап, 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 сталированных), 2 (умеренно сталированных) и 3 (наименее сталированные) делает анализ iCIEF более чувствительным к изменениям, которые происходят в салильных формах образца VEGF-Трап.

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

Стабильность, указывающая на способность метода анализа iCIEF

Образец DP VEGF-Трап для долгосрочного испытания стабильности (выдерживают при температуре 2–8°C) анализируют с применением 7 независимых временных точек, охватывающих период времени 24 месяца; табл. 5 (ниже) иллюстрирует данные, соответствующие этому исследованию. Исторические данные IEF для этих образцов VEGF-Трап предлагают для сравнения и сравнивают с данными iCIEF VEGF-Трап из группирования областей и выдачи результатов пиков 3–9. При условии хранения в режиме реального времени 2–8°C для образцов VEGF-Трап 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-Трап, 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

Фиг. 8 иллюстрирует подбор прямой % областей 1, 2 и 3 VEGF-Трап за период времени 24 месяца с применением iCIEF. Небольшое, но устойчивое увеличение области 1 с уменьшением области 3 видно на графиках.

Дополнительный анализ с применением подвергавшегося принудительному разложению образца DS VEGF-Трап 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 табл. 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-Трап. 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. Фиг. 9 иллюстрирует электрофорограмму подвергавшегося принудительному разложению образца VEGF-Трап с применением метода анализа iCIEF; увеличение кислых видов видно из профиля.

Таблица 6. Процентное распределение подвергавшегося принудительному разложению образца VEGF-Трап, 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

Статистический анализ % распределения трех областей для образца VEGF-Трап, подвергавшегося стрессовому воздействию, осуществляют путем сравнения с соответствующим процентом пиков для не

подвергавшегося стрессовому воздействию образца VEGF. На фиг. 10A-10C показан статистический анализ подвергавшегося стрессовому воздействию образца VEGF-Trap для данных iCIEF. Статистически значимое изменение наблюдают для областей 1 и 3 соответственно.

На основе данных характеристики и оптимизации метода анализа iCIEF, получают параметры анализа и приводят их в табл. 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

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 табл. 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-Trap предлагается на фиг. 11.

Таблица 8. Линейность метода анализа iCIEF

RS VEGF-Trap (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

Анализ демонстрирует приемлемую линейность в диапазоне концентрации белка от 0,5 до 2,0 мг/мл с $R^2 > 0,99$ 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.

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 табл. 9 ниже. Процент восстановления рассчитывают с использованием $\text{процент восстановления} = (\text{процент области измерений} / \text{процент номинальной площади}) \times 100\%$.

Таблица 9. Точность анализа iCIEF VEGF-Trap на основе пропорциональности при разбавлении

RS VEGF-Trap (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

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

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 табл. 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

Предлагаемый метод исследования iCIEF VEGF-Trap демонстрирует приемлемую прецизионность при выполнении разными аналитиками с использованием разных препаратов на основе реагентов. Рассчитывают общее ОСО (относительное стандартное отклонение) в % и оно составляет в пределах ОСО 2% для всех трех областей.

Робастность метода анализа iCIEF. Несколько элементов робастности метода анализа оценивали с помощью различных экспериментов. Эти эксперименты приведены в табл. 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

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 ч. Распределение изоформы для каждого анализа представляют ниже в табл. 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

Абсолютную разницу между образцом, проанализированным в момент времени T=O, и проанализированным еще раз в момент времени T=24 ч, 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 ч при условии хранения при температуре 10°C в анализаторе отличающихся зарядом вариантов iCE3.

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 электроферо-

граммы 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 электроферограммы из трех образцов амфолита приведены на фиг. 12.

Пример. Анализ исторических образцов варианта VEGF-Trap (DS, FDS и DSI) с применением нового метода анализа iCIEF

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 мМ фосфата натрия, 5 мМ цитрата натрия и 100 мМ хлорида натрия), 10 образцов DS VEGF-Trap (лекарственная субстанция C701 SPEC, водный буферный раствор, pH 6,2, содержащий 10 мМ фосфата натрия) и 12 образцов FDS VEGF-Trap (лекарственная субстанция в сформированной смеси, водный буферный раствор C713 SPEC, pH 6,2, содержащий 10 мМ, фосфата натрия, 40 мМ хлорида натрия, 0,03% (мас./об.) полисорбат 20 и 5% (мас./об.) сахарозы). Эти образцы VEGF-Trap анализировали с применением метода анализа iCIEF.

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. Фиг. 13А-13С 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 табл. 13 для одного из образцов амфолита. Табл. 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

Анализ согласованных пар (фиг. 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.

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. Фиг. 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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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 (т.е. претензии, направленные на такие варианты, могут включать отрицательные ограничения).

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.

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 на основе капиллярного изoeлектрического фокусирования с детектированием непосредственно в капилляре (iCIEF) для анализа отличающихся зарядом вариантов ингибитора белка-сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) VEGF-Trap, который включает

загрузку образца белка в разделительный капилляр, который содержит смесь, по меньшей мере, амфолита-носителя, метилцеллюлозы и мочевины;

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 VEGF-Trap в пределах капилляра таким образом, что общий заряд вариантов является нейтральным; и

детектирование и количественное определение отличающихся зарядом вариантов белка VEGF-Trap, включающее:

(i) измерение поглощения множества изоформ отличающихся зарядом вариантов;

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

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

2. Способ по п.1, где детектирование отличающихся зарядом вариантов происходит при длине волны 280 нм.

3. Способ по п.1, где концентрация белка, загруженного в капилляр, составляет 2,0 мг/мл.

4. Способ по п.1, где количество мочевины в смеси составляет 2 М.

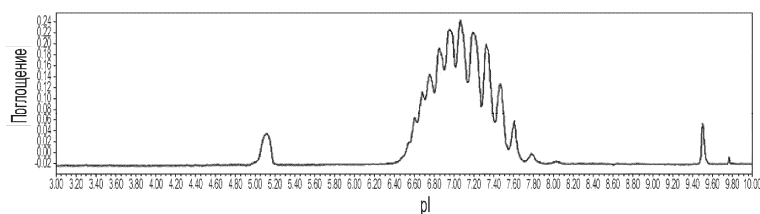
5. Способ по п.1, где смесь содержит 0,35% метилцеллюлозы.

6. Способ по п.1, где первое напряжение составляет 1500 В.

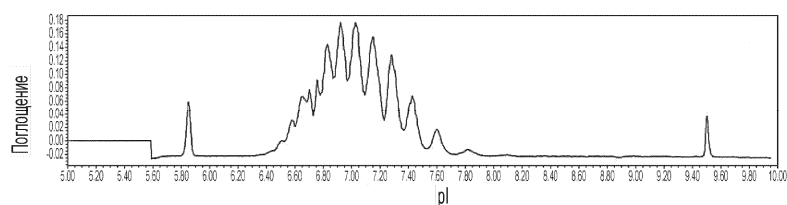
7. Способ по п.1, где первое заранее определенное время составляет 1 мин.

8. Способ по п.1, где второе напряжение составляет 3000 В.

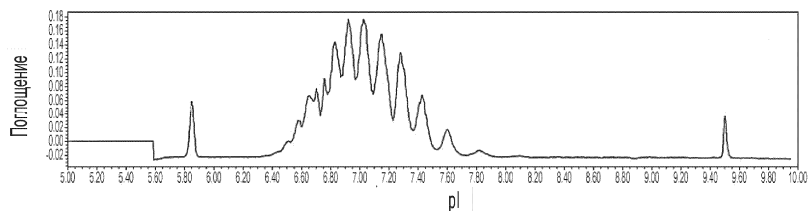
9. Способ по п.1, где второе заранее определенное время составляет 7 мин.
10. Способ по п.1, где концентрация белка, загруженного в капилляр, составляет от 1,0 до 8,0 мг/мл или находится в любом промежуточном интервале.
11. Способ по п.1, где количество мочевины в смеси составляет более 0 М и менее 8 М или находится в любом промежуточном интервале.
12. Способ по п.1, где смесь содержит от 0,01 до 0,35% метилцеллюлозы или находится в любом промежуточном интервале.
13. Способ по п.1, где первое напряжение составляет от 1 до 3000 В или находится в любом промежуточном интервале.
14. Способ по п.1, где первое заранее определенное время составляет от 1 с до 5 мин или находится в любом промежуточном интервале.
15. Способ по п.1, где второе напряжение составляет от 1 до 6000 В или находится в любом промежуточном интервале.
16. Способ по п.1, где второе заранее определенное время составляет от 1 до 14 мин или находится в любом промежуточном интервале.
17. Способ по п.1, где смесь включает 0,35% метилцеллюлозы, 2М мочевины и 3% амфолита-носителя, имеющего рI 3-10.
18. Способ по п.1, где капилляр включает фторуглеродное покрытие.
19. Способ по п.1, где белок VEGF-Trap содержит последовательность SEQ ID NO: 1.
20. Способ по п.1, где:
 - а) смесь включает 2М мочевины, 0,35% метилцеллюлозы и 3% амфолита, имеющего рI 3-10;
 - б) первое напряжение составляет 1500 В и первое заранее определенное время составляет 1 мин;
 - в) второе напряжение составляет 3000 В и второе заранее определенное время составляет 7 мин и
 - д) VEGF-Trap содержит последовательность SEQ ID NO: 1.
21. Способ по п.1, где концентрация белка VEGF-Trap, загруженного в капилляр, составляет от 1,0 мг/мл.



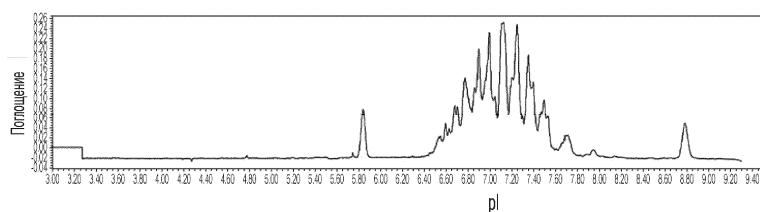
Фиг. 1А



Фиг. 1В

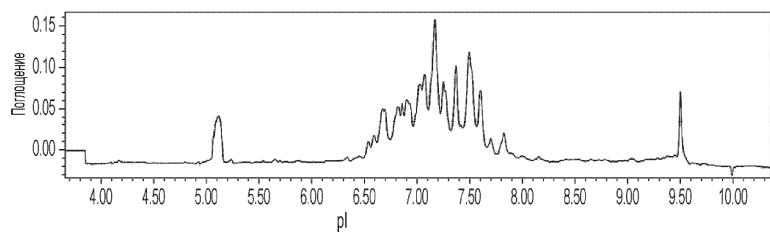


Фиг. 1С

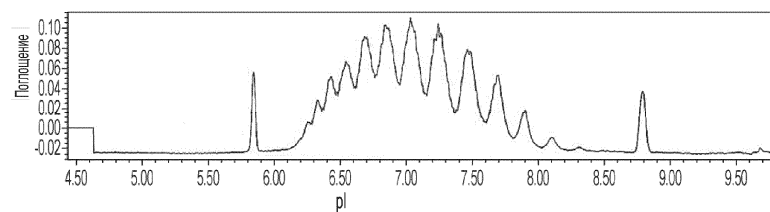


Фиг. 1D

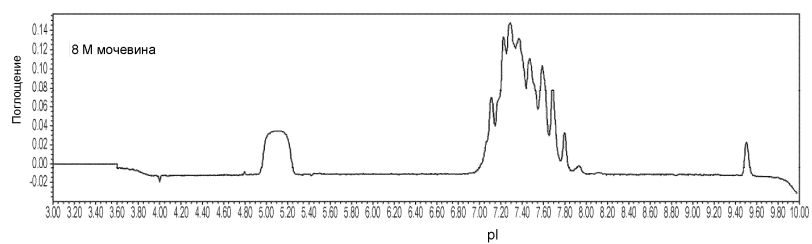
041923



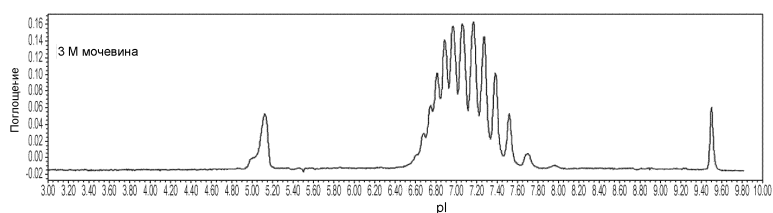
Фиг. 1Е



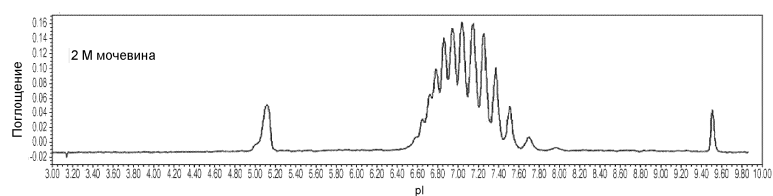
Фиг. 1F



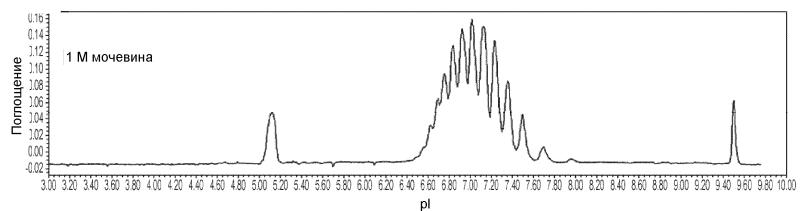
Фиг. 2А



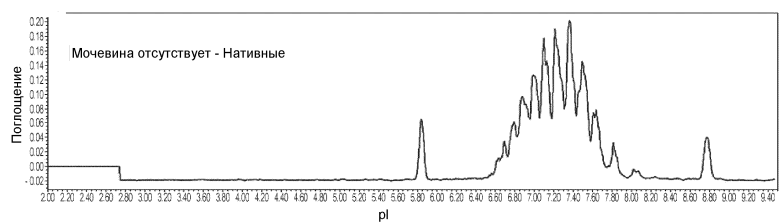
Фиг. 2В



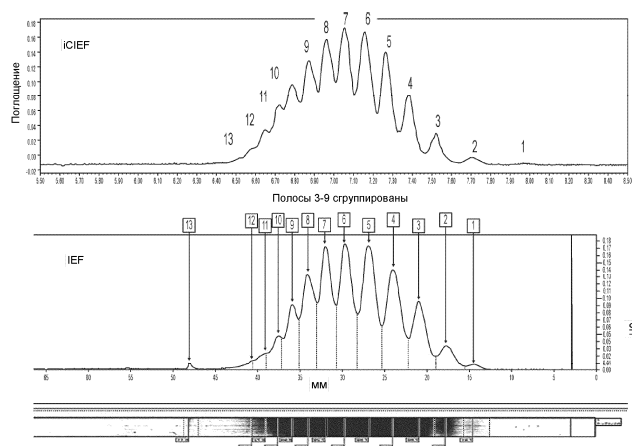
Фиг. 2С



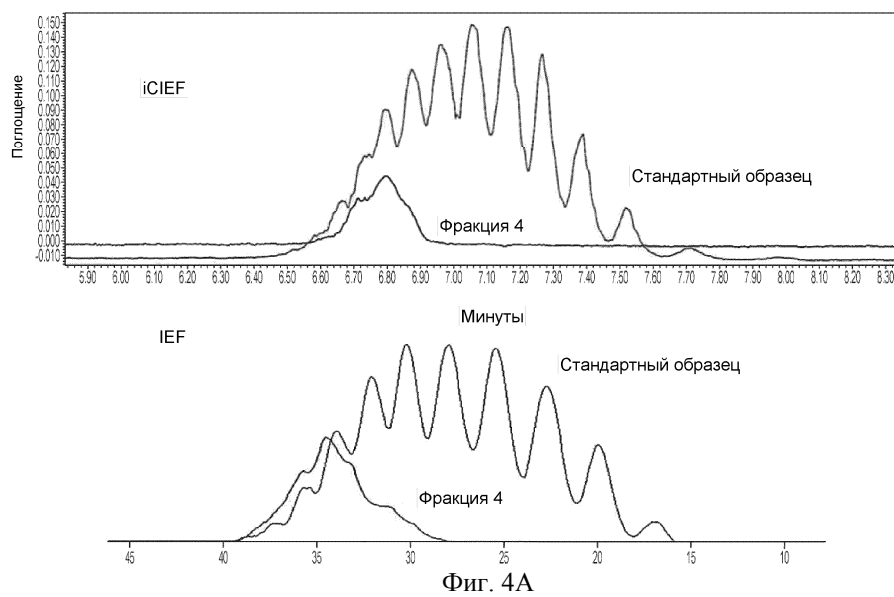
Фиг. 2D



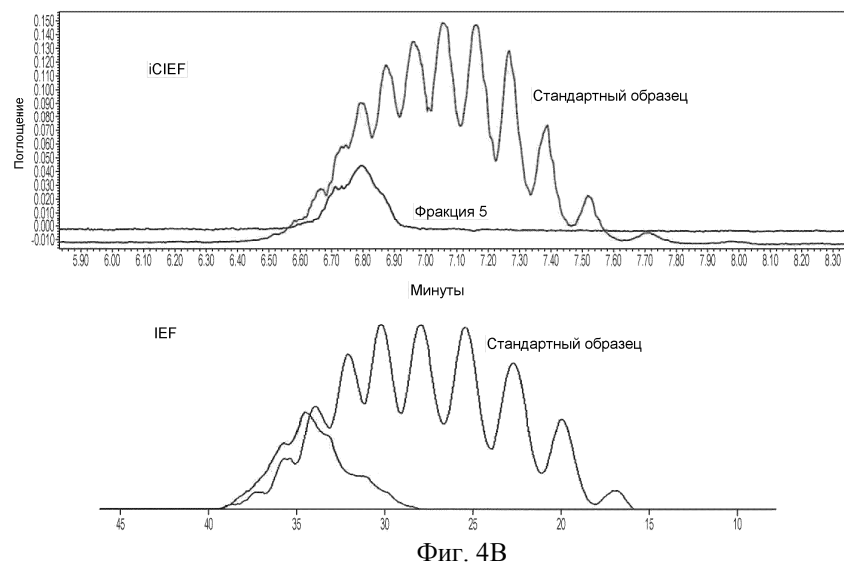
Фиг. 2Е



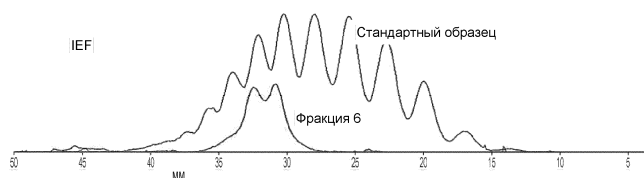
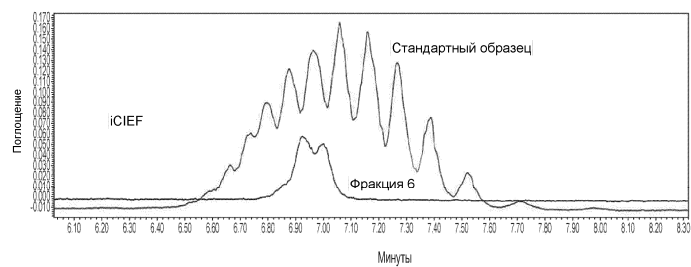
Фиг. 3



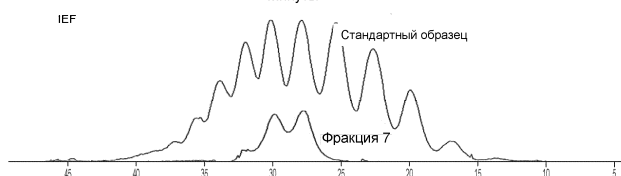
Фиг. 4А



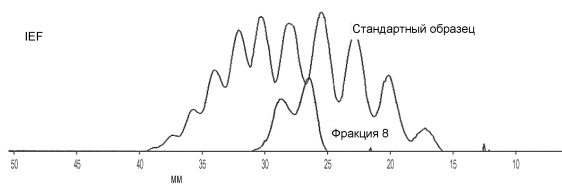
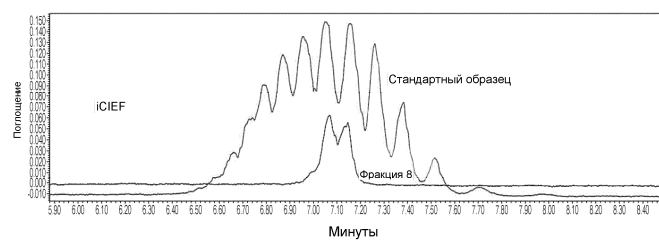
Фиг. 4В



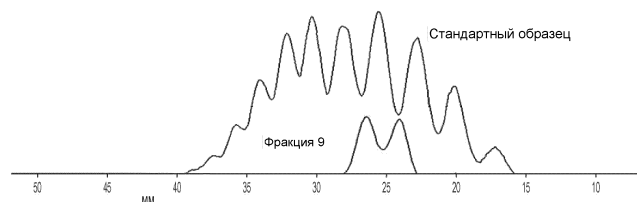
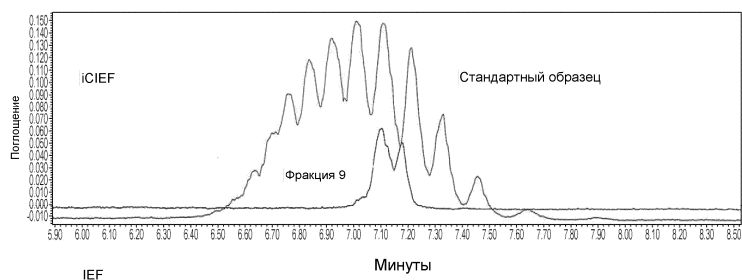
Фиг. 4С



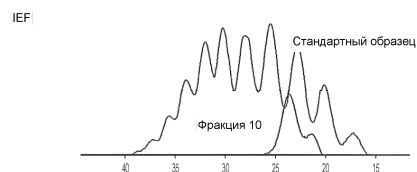
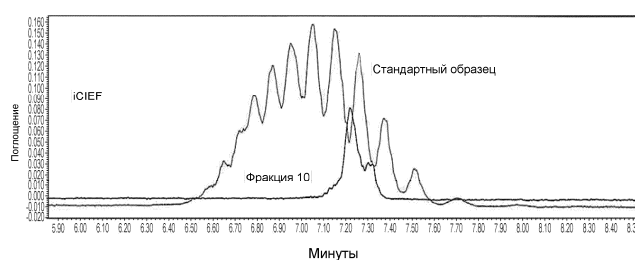
Фиг. 4D



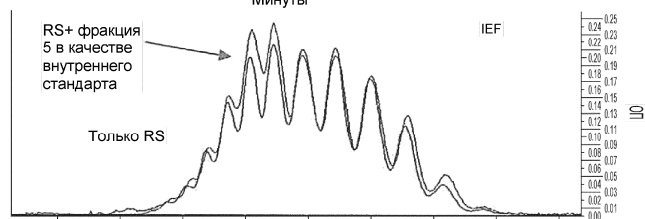
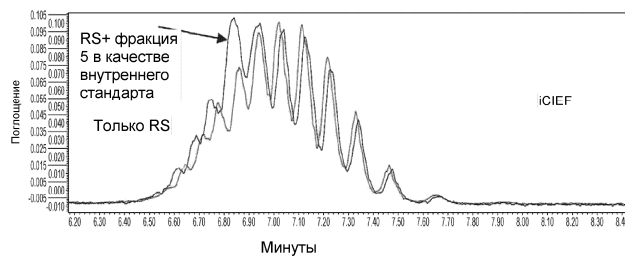
Фиг. 4Е



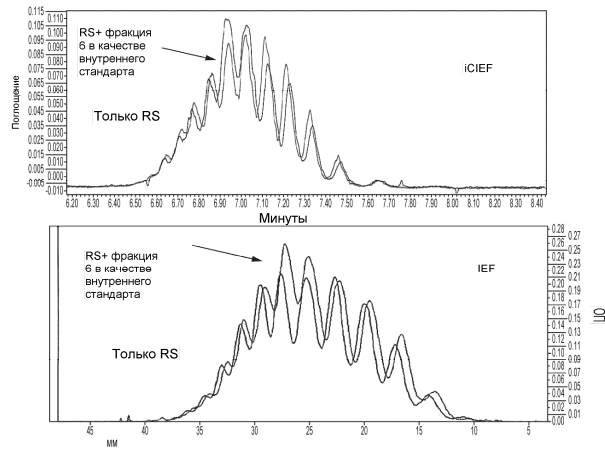
Фиг. 4F



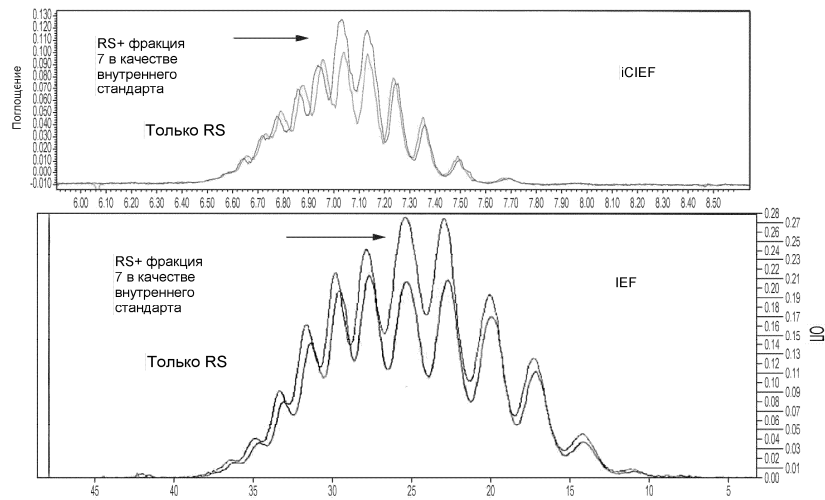
Фиг. 4G



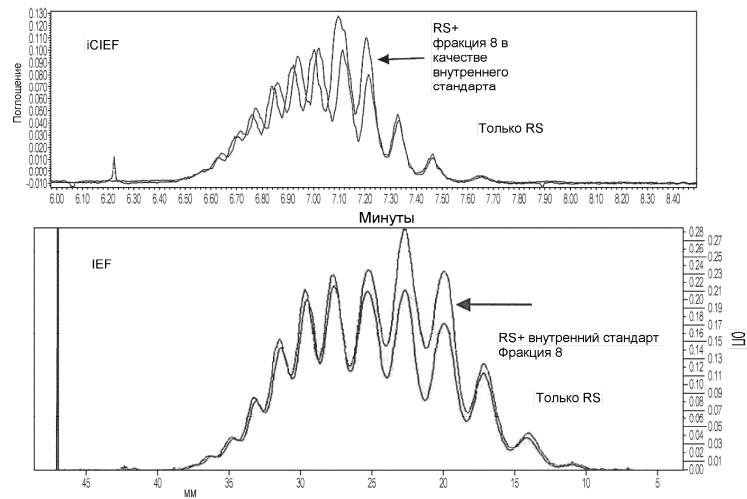
Фиг. 5A



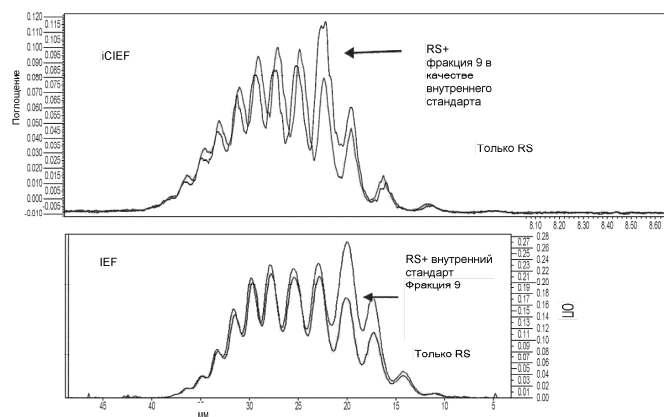
Фиг. 5B



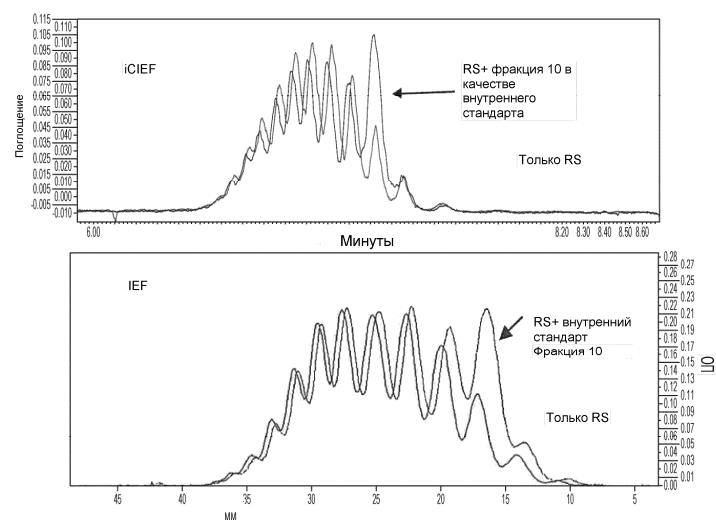
Фиг. 5C



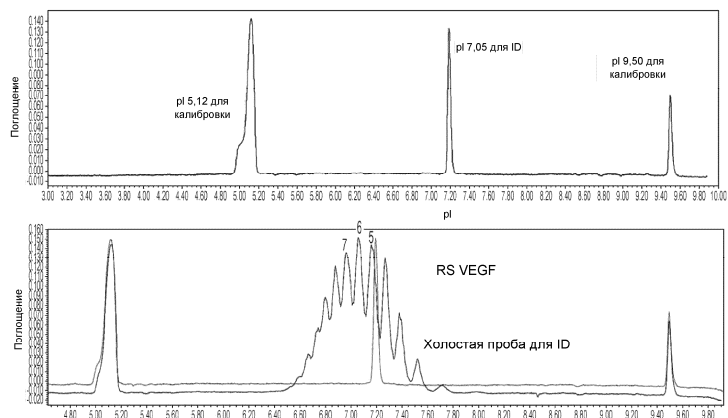
Фиг. 5D



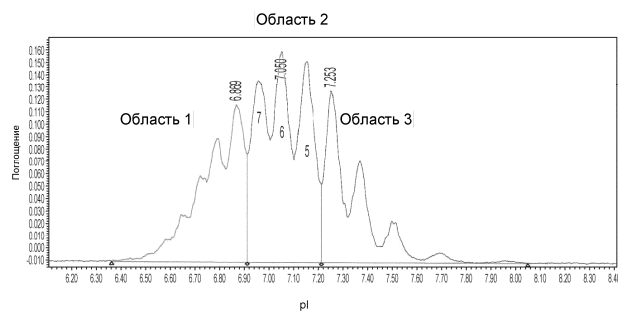
Фиг. 5Е



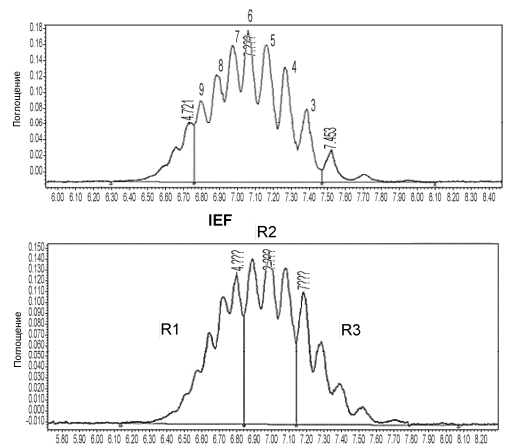
Фиг. 5F



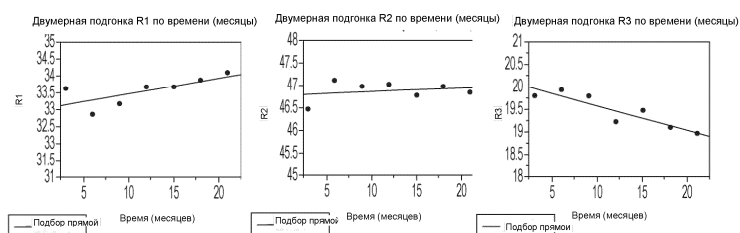
Фиг. 6



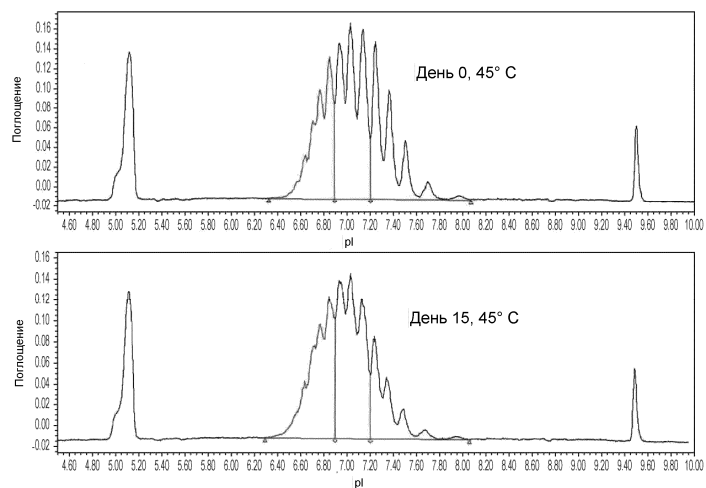
Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 8

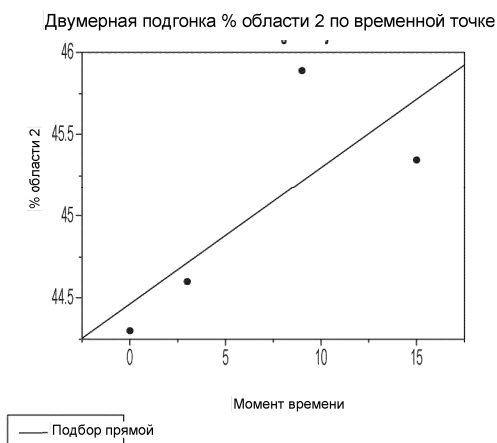


Фиг. 9



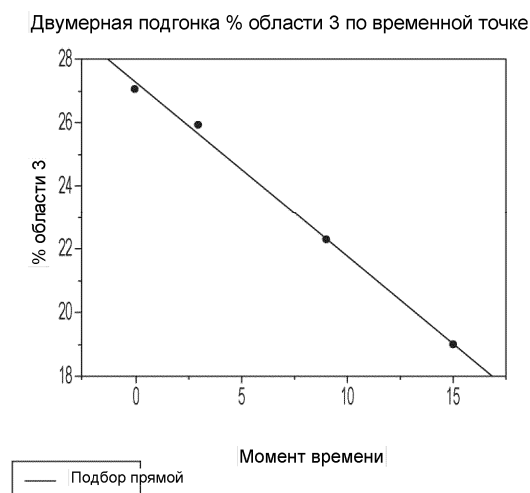
Подбор прямой
% область 1 = 28,262034 + 0,4652542*Временная точка

Фиг. 10А



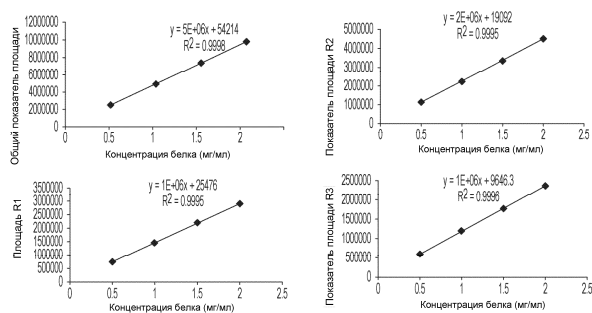
Подбор прямой
 $\% \text{ область } 2 = 44,469831 + 0,0837288 \cdot \text{Временная точка}$

Фиг. 10В

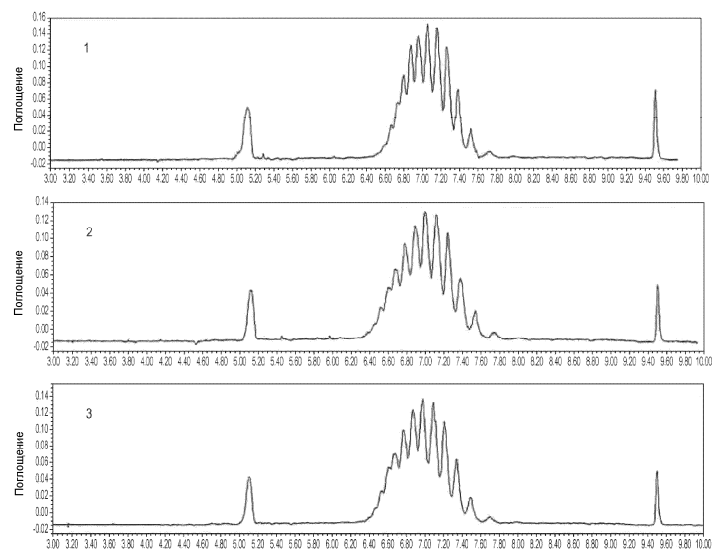


Подбор прямой
 $\% \text{ область } 3 = 27,269492 + 0,5488136 \cdot \text{Временная точка}$

Фиг. 10С

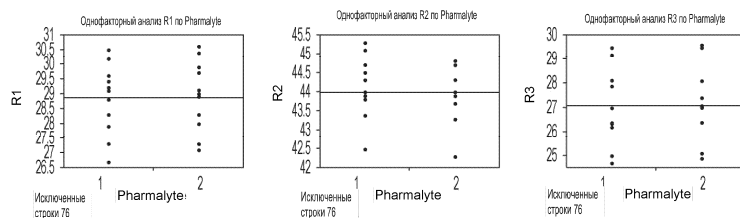


Фиг. 11

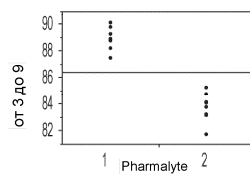


Фиг. 12

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

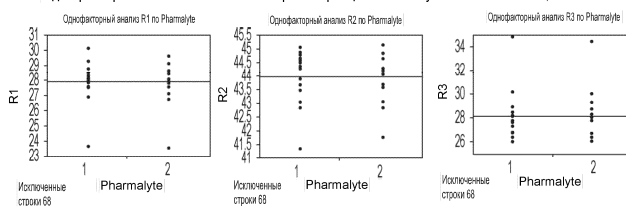


Однофакторный анализ DS VEGF Тгар по образцам Pharmalyte на основе % площади пика 3-9

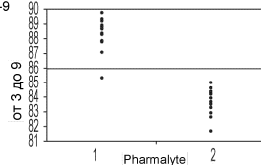


Фиг. 13А

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

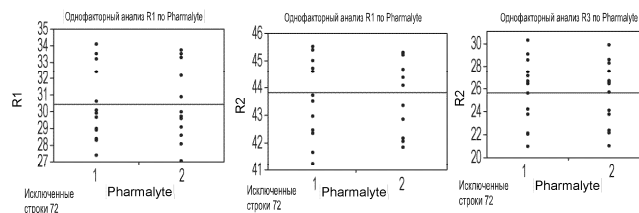


Однофакторный анализ DSI VEGF Тгар по образцам Pharmalyte на основе % площади пика 3-9

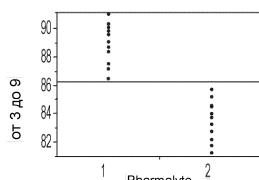


Фиг. 13В

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

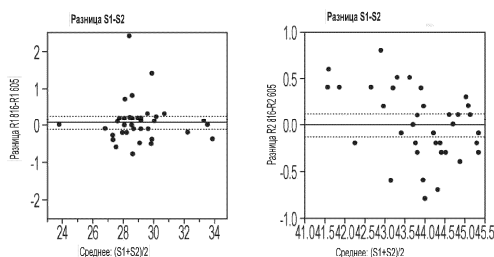


Однофакторный анализ DSI VEGF Trap по образцам Pharmalyte на основе % площади пика 3-9

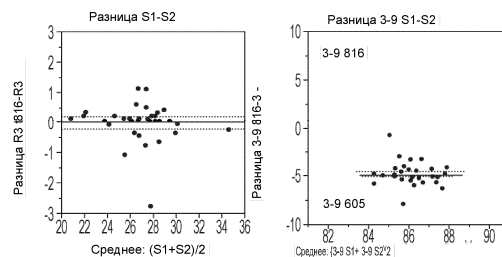


Фиг. 13С

Согласованные пары



S1	29,1243	t-коэфф.	0,758337	S1	43,9189	t-коэфф.	-0,0433
S2	29,0541			S2	43,9216		
Средняя разница	0,07027	Разн.	36	Средняя разница	-0,0027	Разн.	36
Стд. ошибка	0,09286	Вероятн. > t	0,4532	Стд. ошибка	0,06242	Вероятн. > t	0,9657
Верхние 95%	0,2582	Вероятн. < t	0,2266	Верхние 95%	0,12369	Вероятн. < t	0,5271
Нижние 95%	-0,1177	Вероятн. < t	0,7734	Нижние 95%	-0,1233	Вероятн. < t	0,4829
N	37			N	37		
Корреляция	0,95901			Корреляция	0,94393		



S1	26,9784	t-коэфф.	-0,39005	3-9 816	83,7757	t-коэффициент	-
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	0,0000
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		

Фиг. 13D



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2