

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193198** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.02.24

(22) Дата подачи заявки
2020.05.21

(51) Int. Cl. **G01N 33/558** (2006.01)
C07K 1/26 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
G01N 27/447 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА**

(31) **62/850,999**

(32) **2019.05.21**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/034088**

(87) **WO 2020/237095 2020.11.26**

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

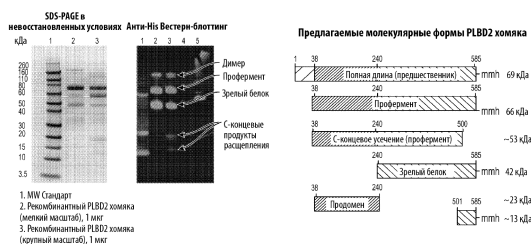
(72) Изобретатель:

**Палакал Ниша, Лу Кунь, Пайлс
Эрика (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Способы обнаружения и/или различия вариантов контаминирующего белка или множества контаминирующих белков в образце по физическому параметру, при этом указанный способ включает разделение белковых компонентов образца по молекулярной массе или по заряду в одном или большем количестве капилляров с помощью капиллярного электрофореза; иммобилизацию белковых компонентов образца в одном или большем количестве капилляров; приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с одним или большим количеством первичных антител, которые специфически связываются с контаминирующим белком или множеством контаминирующих белков в образце, тем самым обнаруживая и/или различая варианты в образце.



A1

202193198

202193198

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571851EA/061

СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[001] Данное изобретение относится к биофармацевтическим препаратам и описывает применение капиллярного электрофореза для обнаружения контаминантных полипептидов в биофармацевтических препаратах, включая белковые контаминанты клетки-хозяина.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[002] Моноклональные антитела (mAb) представляют собой обширный класс биотерапевтических продуктов, в результате применения которых достигают выдающихся успехов в лечении многих опасных для жизни и хронических заболеваний. Однако mAb очищают из очень сложных смесей биологических макромолекул с вариантами размера и заряда, различными посттрансляционными модификациями, включая различные паттерны гликозилирования, а также N- и C-концевой гетерогенностью. Таким образом, каждый индивидуальный препарат моноклональных антител может иметь уникальный профиль белков клетки-хозяина, характеристику, которую необходимо принимать во внимание при оценке этих продуктов как при разработке, так и при изготовлении конечного продукта. Для того, чтобы рекомбинантные биофармацевтические белки были приемлемыми для введения пациентам-людям, важно, чтобы из конечного биологического продукта были удалены остаточные примеси, возникающие в процессе изготовления и очистки. Эти компоненты процесса включают белки культуральной среды, иммуноглобулиновые аффинные лиганды, вирусы, эндотоксин, ДНК и белки клетки-хозяина. Эти примеси клетки-хозяина включают специфические для процесса белки клетки-хозяина (HCP), которые представляют собой связанные с процессом примеси/контаминанты в биопрепаратах, полученных в результате применения технологии рекомбинантной ДНК. Хотя HCP обычно присутствуют в конечной лекарственной субстанции в небольших количествах (в миллионных долях или нанограммах на миллиграмм предполагаемого рекомбинантного белка), признано, что HCP являются нежелательными, и их количество следует минимизировать. Например, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) требует, чтобы биофармацевтические препараты, предназначенные для применения у человека *in vivo*, были как можно более свободными от посторонних примесей, и требует тестов для обнаружения и количественного определения потенциальных контаминантов/примесей, таких как HCP. Кроме того, Международная конференция по гармонизации (ICH) предлагает руководящие положения относительно проведения процедур испытаний и критериев приемлемости для биотехнологических/биологических продуктов. В руководящих положениях для HCP предлагается использовать чувствительный иммуноанализ, способный обнаруживать широкий спектр белковых примесей.

[003] Чувствительные аналитические методы, такие как LC-MS/MS, могут применяться для идентификации и количественного определения отдельных видов НСР, присутствующих в избытке белковых компонентов. После идентификации таких отдельных видов НСР необходимо разработать альтернативные анализы с достаточной чувствительностью и специфичностью, которые могут быть валидированы для утверждения регулирующими органами и которые могут применяться в качестве платформы для множества рекомбинантных белковых продуктов.

[004] Электрофорез применяли для разделения смесей молекул на основе их различной скорости движения в электрических полях. Обычно электрофорез относится к перемещению взвешенных или растворенных молекул через жидкость или гель под действием электродвижущей силы, приложенной к одному или большему количеству электродов или электропроводящих элементов, контактирующих с жидкостью или гелем. Некоторые известные способы электрофоретического разделения включают разделение молекул на основе, по меньшей мере частично, различий в их подвижностях в буферном растворе (обычно называемом зональным электрофорезом), в растворе геля или полимера (обычно называемом гель-электрофорезом) или в потенциале градиента водорода (pH) (обычно называемом изоэлектрическим фокусированием). Несмотря на то, что методы капиллярного электрофореза эффективны и широко применяются в промышленности для изучения чистоты биомолекул и неоднородности заряда, они не позволяют селективно обнаруживать различные виды или дифференцировать примеси продукта и процесса. Соответственно, необходимы дополнительные способы мониторинга препаратов mAb и составов для обнаружения белковых примесей клетки-хозяина.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[005] В одном аспекте данного изобретения предлагается способ обнаружения представляющих интерес белковых примесей в образце препарата антитела, при этом указанный способ включает: разделение белковых компонентов образца по физическому параметру в одном или большем количестве капилляров с помощью капиллярного электрофореза; иммобилизацию белковых компонентов образца в одном или большем количестве капилляров; приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с одним или большим количеством первичных антител, которые специфически связываются с представляющим интерес белковым контаминантом; и обнаружение связывания одного или большего количества первичных антител, тем самым обнаруживая и количественно определяя представляющие интерес белковые контаминанты в образце препарата антитела.

[006] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает различение вариантов представляющего интерес белкового контаминанта в образце препарата антитела по физическому параметру.

[007] В различных вариантах осуществления данного способа один или большее количество капилляров содержат разделительную матрицу.

[0008] В различных вариантах осуществления данного способа разделительная матрица содержит амфолиты-носители.

[0009] В различных вариантах осуществления данного способа физический параметр включает заряд.

[0010] В различных вариантах осуществления данного способа разделительная матрица включает просеивающую матрицу, сконфигурированную для разделения белков по молекулярной массе.

[0011] В различных вариантах осуществления данного способа физический параметр включает молекулярную массу.

[0012] В различных вариантах осуществления данного способа одно или большее количество первичных антител помечены детектируемой меткой, и обнаружение связывания одного или большего количества первичных антител включает обнаружение детектируемой метки.

[0013] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения определение связывания одного или большего количества первичных антител включает: приведение в контакт одного или большего количества первичных антител со вторичным антителом, которое специфически связывает по меньшей мере одно из одного или большего количества первичных антител, и при этом вторичное антитело имеет детектируемую метку; а также обнаружение детектируемой метки.

[0014] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает обнаружение и/или различие вариантов заряда или размера представляющих интерес белковых контаминантов.

[0015] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает определение относительного или абсолютного количества представляющих интерес белковых контаминантов.

[0016] В различных вариантах осуществления данного способа детектируемая метка включает хемилюминесцентную метку, флуоресцентную метку или биолуминесцентную метку.

[0017] В различных вариантах осуществления данного способа образец включает внутренний стандарт.

[0018] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммобилизация включает фотоиммобилизацию, химическую иммобилизацию или термическую иммобилизацию.

[0019] В различных вариантах осуществления данного способа одно или большее количество первичных антител включают поликлональные антитела.

[0020] В различных вариантах осуществления данного способа одно или большее количество первичных антител включают моноклональные антитела.

[0021] В различных вариантах осуществления данного способа представляющие интерес белковые контаминанты включают PLBD2, CTSD, TIMP1, кислотную церамидазу

(ASAH1), лизосомальную кислотную липазу (LAL), аннексин, катепсин В, антилейкопротеиназу (ALP) или их фрагменты.

[0022] В другом аспекте данного изобретения предлагается способ обнаружения и/или различения представляющих интерес белковых контаминантов в образце препарата антитела по физическому параметру, при этом указанный способ включает: разделение белковых компонентов образца по физическому параметру в одном или большем количестве капилляров с помощью капиллярного электрофореза; иммобилизацию белковых компонентов образца в одном или большем количестве капилляров; приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с первым первичным антителом, которое специфически связывается с первыми представляющими интерес белковыми контаминантами; обнаружение связывания первого первичного антитела, тем самым обнаруживая первое представляющее интерес антитело; приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров со вторым первичным антителом, которое специфически связывается со вторым представляющим интерес белковым контаминантом; и обнаружение связывания второго первичного антитела, тем самым обнаруживая представляющие интерес белковые контаминанты и различая представляющие интерес белковые контаминанты в образце.

[0023] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с третьим первичным антителом, которое специфически связывается с третьим представляющим интерес белковым контаминантом; обнаружение связывания третьего первичного антитела, тем самым обнаруживая представляющий интерес третий белковый контаминант.

[0024] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с одним или большим количеством дополнительных первичных антител, которые специфически связываются с одним или большим количеством дополнительных представляющих интерес белковых контаминантов; обнаружение связывания одного или большего количества дополнительных первичных антител, тем самым обнаруживая один или большее количество дополнительных представляющих интерес белковых контаминантов.

[0025] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает различение вариантов представляющих интерес белковых контаминантов в образце препарата антитела по физическому параметру.

[0026] В различных вариантах осуществления данного способа один или большее количество капилляров содержат разделительную матрицу.

[0027] В различных вариантах осуществления данного способа разделительная матрица содержит амфолиты-носители.

[0028] В различных вариантах осуществления данного способа физический параметр включает заряд.

[0029] В различных вариантах осуществления данного способа разделительная матрица включает просеивающую матрицу, сконфигурированную для разделения белков по молекулярной массе.

[0030] В различных вариантах осуществления данного способа физический параметр включает молекулярную массу.

[0031] В различных вариантах осуществления данного способа первичные антитела помечены детектируемой меткой, и обнаружение связывания указанных первичных антител включает обнаружение детектируемой метки.

[0032] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения определение связывания первичных антител включает: приведение в контакт первичных антител со вторичным антителом, которое специфически связывает первичные антитела, и при этом вторичное антитело имеет детектируемую метку; а также обнаружение детектируемой метки.

[0033] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает определение относительного или абсолютного количества одного или более представляющих интерес белковых контаминантов.

[0034] В различных вариантах осуществления данного способа детектируемая метка включает хемилюминесцентную метку, флуоресцентную метку или биолуминесцентную метку.

[0035] В различных вариантах осуществления данного способа образец включает внутренний стандарт.

[0036] В различных вариантах осуществления данного способа одно или большее количество первичных антител включают поликлональные антитела.

[0037] В различных вариантах осуществления данного способа одно или большее количество первичных антител включают моноклональные антитела.

[0038] В различных вариантах осуществления данного способа иммобилизация включает фотоиммобилизацию, химическую иммобилизацию или термическую иммобилизацию.

[0039] В различных вариантах осуществления данного способа представляющие интерес белковые контаминанты включают PLBD2, CTSD, TIMP1, кислотную церамидазу (ASAH1), *лизосомальную кислотную липазу (LAL)*, *аннексин В*, *антилейкопротеиназу (ALP)* или их фрагменты.

[0040] В различных вариантах осуществления данного изобретения любые из признаков или компонентов вариантов осуществления, описанных выше или в данном документе, могут быть объединены, и такие комбинации входят в объем данного изобретения. Любое конкретное значение, описанное выше или в данном документе, может быть объединено с другим связанным значением, описанным выше или в данном документе, чтобы указать диапазон со значениями, представляющими верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны входят в объем данного изобретения.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0041] Фиг. 1А представляет собой цифровое изображение SDS-PAGE и вестерн-блоттинга, демонстрирующее формы препарата полипептида PLBD2.

[0042] Фиг. 1В представляет собой диаграмму, демонстрирующую предлагаемые формы PLBD2.

[0043] Фиг. 2 представляет собой набор цифровых изображений вестерн-блоттинга с применением выбранных препаратов антител анти-PLBD2. Мышей иммунизировали с применением рекомбинантного PLBD2 или полосок НИС для получения анти-PLBD2 mAb. Гибридомы скринировали на специфичность с помощью вестерн-блоттинга, и 10 были отобраны для очистки и биотинилирования. Зрелый белок PLBD2 (~ 42 кДа) не был обнаружен ни в одной из гибридом. Были идентифицированы антитела, нацеленные на N-конец.

[0044] Фиг. 3 представляет собой гистограмму, демонстрирующую активность антител анти-PLBD2. Из этих исследований были выбраны покрытие mAb09 и обнаружение биотинилированных козых pAb для окончательного формата сэндвич-ИФА.

[0045] Фиг. 4 представляет собой схематическое изображение сэндвич-ИФА с применением выбранных антител анти-PLBD2.

[0046] Фиг. 5 представляет собой стандартную кривую, построенную для выбранной пары антител анти-PLBD2.

[0047] Фиг. 6 представляет собой типовой рабочий процесс для разделения и обнаружения полипептидных контаминантов с помощью капиллярного электрофореза с учетом приблизительной молекулярной массы.

[0048] На Фиг. 7 приведен набор фигур, демонстрирующих анализ PLBD2 в зависимости от концентрации в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Этот результат демонстрирует количественное определение PLBD2 в образце антител.

[0049] Фиг. 8 представляет собой схему типового рабочего процесса для разделения и обнаружения полипептидов с помощью капиллярного электрофореза с учетом заряда.

[0050] На Фиг. 9 приведены результаты визуализированного анализа заряда cIEF-вестерн (icIEF-Western). PLBD2 обнаруживается с помощью анти-PLBD2 pAb. PLBD2 отсутствует в процессе C2P2, и включение образца подтверждает, что CE-вестерн специфически улавливает пики PLBD2 в области 5-6.

[0051] На Фиг. 10 приведены результаты визуализированного анализа заряда cIEF-вестерн (icIEF-Western). Нативный PLBD2 можно увидеть в диапазоне pH 5-6 на фигуре справа. Это было обнаружено в процессе mAb, демонстрируя способность этого способа селективно обнаруживать PLBD2 из технологических образцов. В этом режиме заряда, для обнаружения примесей в технологическом образце можно применять определенные поликлональные и/или моноклональные антитела к PLBD2.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0052] Перед тем как продолжить описание данного изобретения, необходимо принять во внимание, что это изобретение не ограничено конкретными описанными

способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Кроме того, следует понимать, что терминология данного документа применяется для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления могут комбинироваться друг с другом, и такие комбинации в явном виде охватываются объемом данного изобретения.

[0053] Если не определено иначе, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют такое же значение, как обычно понимаемые специалистом в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. В контексте данного документа термин «около» касательно конкретного цитируемого числового значения означает, что данное значение может отличаться от цитируемого значения не более чем на 1%. Например, в контексте данного документа выражение «около 100» включает в себя 99 и 101, и все значения между ними (*например*, 99,1; 99,2; 99,3; 99,4 и т. д.).

[0054] Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно применять при практической реализации или испытании данного изобретения, далее описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упоминаемые в этом описании, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

[0055] Сокращения, применяемые в данном документе

[0056] mAb: Моноклональное антитело

[0057] biAb: Биспецифическое антитело

[0058] CE: Капиллярный электрофорез

[0059] SDS: Додecilсульфат натрия

[0060] icIEF: Визуализированный icIEF

[0061] icIEF-вестерн: CE-вестерн на основе заряда

[0062] IEC: Ионообменная хроматография;

[0063] QC: Контроль качества

[0064] HRP: Пероксидаза хрена

[0065] HCP: Белки клетки-хозяина

[0066] Определения

[0067] Термин «антитело», применяемый в данном документе, предназначен для обозначения иммуноглобулиновых молекул, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (*т. е.* «полными молекулами антител»), а также их мультимерами (*например*, IgM) или их антигенсвязывающими фрагментами. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_H1, C_H2 и C_H3). В различных вариантах осуществления данного изобретения тяжелая цепь может представлять собой

изотип IgG. В некоторых случаях тяжелую цепь выбирают из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения тяжелая цепь является изотипом IgG1 или IgG4, необязательно включая в себя химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает в себя обозначение как гликозилированных, так и на негликозилированных иммуноглобулинов любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает в себя молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Обзор структуры антител см. в публикации Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) *Dev. Comp. Immunol.* 55-77 (2003); и M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1) *Surv. Immunol. Res.* 27-42 (1983).

[0068] Термин антитело также охватывает «биспецифическое антитело», включающее в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним эпитопом. Одна половина биспецифического антитела, включающая в себя одну тяжелую цепь, одну легкую цепь и шесть CDR, связывается с одним антигеном или эпитопом, а другая половина антитела связывается с другим антигеном или эпитопом. В некоторых случаях биспецифическое антитело может связывать один и тот же антиген, но разными эпитопами или не перекрывающимися эпитопами. В некоторых случаях обе половины биспецифического антитела имеют одинаковые легкие цепи, сохраняя при этом двойную специфичность. Биспецифические антитела в целом описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527(30 декабря 2010 г.).

[0069] Термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или «антигенсвязывающий фрагмент») относится к одному или большему количеству фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающая часть» антитела, включают в себя (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, бивалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 241 544-546), который состоит из домена VH; (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием единой

белковой цепи, в которой области VL и VH создают пару с образованием моновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином «антитело» (см., например, публикацию Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448; и Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

[0070] Более того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, широко известных в данной области техники (см. Публикацию Sambrook et al., 1989).

[0071] Термин «антитело человека» предназначено для включения в себя антител, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. mAb человека по данному изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин «антитело человека», применяемый в данном документе, не предназначен для включения в себя mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например мыши), были привиты на последовательности FR человека. Указанный термин включает в себя антитела, рекомбинантно продуцируемые в организме млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Данный термин не включает в себя антитела, выделенные у человека-субъекта или полученные от него.

[0072] В контексте данного документа термин «образец» относится к смеси молекул, состоящей по меньшей мере из одного представляющего интерес полипептида, такого как моноклональное антитело, биспецифическое антитело и/или один или большее количество белковых контаминантов клетки-хозяина (НСП), которые подвергается манипуляциям в соответствии со способами данного изобретения, включая, например, разделение, анализ, экстрагирование, концентрирование или профилирование.

[0073] Термины «анализ» или «анализирование», используемые в настоящем документе, применяются взаимозаменяемо и относятся к любому из различных методов разделения, обнаружения, выделения, очистки, солубилизации, обнаружения и/или определения характеристик представляющих интерес молекул (например, полипептидов, таких как антитела и контаминанты НСП) в биофармацевтических препаратах, таких как препараты антител.

[0074] В контексте данного документа термин «хроматография» относится к процессу разделения смеси, например смеси, содержащей пептиды, белки, полипептиды и/или антитела, такие как моноклональные антитела. Указанный процесс включает в себя прохождение смеси через стационарную фазу, которая разделяет молекулы, представляющие интерес, от других молекул в смеси и позволяет выделять одну или больше количество молекул, представляющих интерес. В описанном в данном документе способе хроматография относится к капиллярному электрофорезу, включая капиллярный

электрофорез на основе размера и изоэлектрическое фокусирование или капиллярный электрофорез на основе заряда.

[0075] В контексте данного документа термин «приведение в контакт» включает объединение по меньшей мере двух веществ в растворе или твердой фазе, например, приведение в контакт образца с антителом, таким как антитело, которое специфически связывается с представляющей интерес молекулой, такой как контаминант НСР.

[0076] В контексте данного документа термин «выделенный» относится к биологическому компоненту (такому как антитело, например моноклональное антитело), который был по существу отделен, получен отдельно или очищен от других биологических компонентов в клетке организма, в которой компонент естественным образом встречается или трансгенетически экспрессируется, а именно от других хромосомных и экстрахромосомных ДНК и РНК, белков, липидов и метаболитов. Таким образом, к нуклеиновым кислотам, пептидам, белкам, липидам и метаболитам, которые были «выделены», относятся нуклеиновые кислоты, пептиды, белки, липиды и метаболиты, очищенные стандартными или нестандартными методами очистки. Термин также охватывает нуклеиновые кислоты, пептиды, белки, липиды и метаболиты, полученные рекомбинантной экспрессией в клетке-хозяине, а также химически синтезированные пептиды, липиды, метаболиты и нуклеиновые кислоты.

[0077] Термины «пептид», «белок» и «полипептид» относятся, взаимозаменяемо, к полимерам аминокислот и/или аналогам аминокислот, которые соединяются пептидными связями или имитациями пептидных связей. Двадцать встречающихся в природе аминокислот и их однобуквенные и трехбуквенные обозначения следующие: Аланин A Ala; Цистеин C Cys; Аспарагиновая кислота D Asp; Глутаминовая кислота E Glu; Фенилаланин F Phe; Глицин Gly; Гистидин H His; Изолейцин I Ile; Лизин K Lys; Лейцин L Leu; Метионин M Met; Аспарагин N Asn; Пролин P Pro; Глутамин Q Gin; Аргинин R Arg; Серин S Ser; Треонин T Thr; Валин V Val; Триптофан W Trp и Тирозин Y Tyr. В одном варианте осуществления данного изобретения пептид представляет собой антитело или его фрагмент или часть, например, любой из фрагментов или цепей антитела, перечисленных выше. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептид может быть модифицирован посттрансляционно. В другом варианте осуществления данного изобретения пептид представляет собой контаминант НСР.

[0078] Термины «обнаруживать» и «обнаружение» имеют свое стандартное значение и предназначены для охвата обнаружения, включая присутствие или отсутствие, измерение и/или характеристику представляющего интерес белка, такого как контаминантный полипептид, например, НСР.

[0079] В контексте данного документа термины «представляющий интерес белок» и/или «целевой белок, представляющий интерес» относятся к любому белку, который должен быть разделен и/или обнаружен с помощью способов, представленных в данном документе. Пригодные представляющие интерес белки включают контаминирующие белки в препаратах антител, такие как НСР.

[0080] В контексте данного документа термины «стандарт» и/или «внутренний стандарт» относятся к хорошо охарактеризованному веществу с известным количеством и/или идентичностью (например, известной молекулярной массой, профилем электрофоретической подвижности), которое может быть добавлено к образцу, а также как к стандарту, так и к молекулам в образце на основе молекулярной массы или изоэлектрической точки с помощью электрофореза). Дополнительно сравнение стандарта обеспечивает количественную или полуколичественную меру количества анализируемого вещества, такого как контаминантный белок, присутствующий в образце, например, НСР.

[0081] Общее описание

[0082] Характеризация контаминирующих вариантов белка клетки-хозяина важна для определения их потенциального влияния на очистку потенциальных или использованных терапевтических антител. Помимо характеристики mAb, понимание природы белковых контаминантов является еще одним важным фактором в разработке терапевтических mAb. Например, контроль остаточного белка А, НСР, остаточной ДНК и других потенциальных остатков культуры или очистки обычно является частью спецификации лекарственной субстанции. Кроме того, такой контроль дает ценную информацию о согласованности и производительности процесса. Таким образом, в данном документе описаны способы обнаружения белков клетки-хозяина (НСР) на основе размера и/или заряда, например, с применением антител, таких как моноклональные или поликлональные антитела, специфичные для НСР, например, контаминирующих белков, представляющих интерес. Описанные способы позволяют обнаруживать и визуализировать проблемные НСР и их различные виды в технологических образцах (см., например, Фигуры 1А и 1В, на которых продемонстрирована гетерогенность белка PLBD2 хомяка, распространенного контаминанта в образцах, очищенных из клеток CHO). В контексте данного документа «PLBD2» относится к гену или продукту гена, например, белок PLBL2, продуцируемый геном PLBD2. Таким образом, термин «PLBD2» может относиться к гену или продукту гена, который является синонимом белка PLBL2. Эти способы позволяют обнаруживать и отображать различные виды данной примеси НСР при низких уровнях ppm. Таким образом, аспекты этого изобретения включают способ обнаружения представляющих интерес белковых контаминантов в образце препарата моноклонального антитела. Способность различать в биологическом образце более контаминирующие белки клетки-хозяина, представляющие интерес, или их фрагменты, становится все более важной, поскольку активность белка и/или фрагментов может иметь различное влияние на активность активного агента, такого как терапевтическое антитело. Таким образом, существует потребность в разработке способов характеристики потенциальных терапевтических mAb и потенциальных контаминантов препаратов mAb. Описанные в данном документе способы удовлетворяют этим потребностям.

[0083] В данном документе описан способ обнаружения и/или различения вариантов контаминирующих белков клетки-хозяина в биологическом образце, таком как препарат моноклональных антител (mAb), по физическому параметру, такому как

молекулярная масса или изоэлектрическая точка контаминирующего белка клетки-хозяина. Описанные способы можно применять при оценке качества препаратов антител. В вариантах осуществления указанного способа образец, который включает контаминирующий белок клетки-хозяина или множество представляющих интерес контаминирующих белков клетки-хозяина, выделяют или разделяют с помощью капиллярного электрофореза, например, на одном или большем количестве капилляров СЕ-системы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец выделяют или разделяют по молекулярной массе. Выделение по молекулярной массе позволяет определить, какие фрагменты или виды контаминирующих белков клетки-хозяина присутствуют в образце. В определенных вариантах осуществления данного изобретения образец выделяют или разделяют по заряду, например, с помощью изоэлектрического фокусирования. Разделение контаминирующих белков клетки-хозяина по заряду имеет дополнительное преимущество, поскольку позволяет определять гомогенность контаминирующих белков клетки-хозяина, например, изменения поверхностного заряда контаминирующих белков клетки-хозяина, которые нелегко увидеть при разделении по молекулярной массе. В определенных вариантах осуществления данного изобретения образец выделяют или разделяют в одном капилляре. В определенных вариантах осуществления данного изобретения образец выделяют или разделяют во множестве капилляров, например, параллельно.

[0084] После того, как белковые компоненты были выделены или разделены в одном или большем количестве капилляров, белковые компоненты, например, представляющие интерес контаминирующие белки клетки-хозяина, иммобилизуются в капилляре, так что относительное положение представляющих интерес контаминирующих белков клетки-хозяина сохраняется в одном или большем количестве капилляров. В вариантах осуществления данного изобретения представляющий интерес контаминирующий белок клетки-хозяина обнаруживают путем приведения в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров, включая представляющий интерес контаминирующий белок клетки-хозяина, с одним или большим количеством первичных антител, которые специфически связываются с представляющим интерес контаминирующим белком клетки-хозяина или его фрагментами для обнаружения присутствия контаминирующего белка клетки-хозяина или его фрагментов. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает обнаружение связывания одного или большего количества первичных антител, например, из-за того, что его подвижность в капилляре нарушена иммобилизацией самого антитела или его фрагмента. Обнаружение связывания первичного антитела, например, по длине капилляра, позволяет обнаруживать и/или различать варианты заряда или размера контаминирующих белков клетки-хозяина, представляющих интерес, или их фрагментов в образце, в зависимости от того, подвергался образец разделению по массе или по заряду соответственно. В качестве примера в отношении разделения по молекулярной массе, чем меньше размер фрагмента, тем дальше в пределах капилляра можно ожидать его

перемещения. В вариантах осуществления данного изобретения образец может содержать множество, например, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или большее количество контаминирующих белков клетки-хозяина, представляющих интерес, или их фрагментов, каждый из которых может быть обнаружен с применением первичного антитела, которое специфично связывается с индивидуальным контаминирующим белком (белками) клетки-хозяина, представляющим интерес, или его фрагментами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает определение относительного или абсолютного количества вариантов контаминирующих белков клетки-хозяина, представляющих интерес, в образце, например, путем измерения высоты или площади пика, которая соответствует количеству обнаруженного меченого первичного антитела, и, следовательно, сколько контаминирующего белка клетки-хозяина или его фрагментов доступно для связывания меченым первичным антителом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляющие интерес контаминирующие белки клетки-хозяина включают один или большее количество из следующих агентов: PLBD2, CTSD, TIMP1, кислотная церамидаза (ASAHI), лизосомальная кислотная липаза (LAL), аннексин, катепсин В, антилейкопротеиназа (ALP) или их фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляющие интерес белковые контаминанты включают PLBD2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец включает один или большее количество внутренних стандартов, например, лэддер стандартов молекулярной массы, лэддер стандартов изоэлектрической точки или даже стандарт, применяемый в качестве исходного уровня или эталона для определения количества представляющего интерес контаминирующего белка клетки-хозяина или его фрагмента, в образце. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает обнаружение и/или различение вариантов заряда или размера представляющих интерес белковых контаминантов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения можно определить относительное или абсолютное количество представляющих интерес белковых контаминантов. В различных вариантах осуществления указанного способа одно или большее количество первичных антител включают поликлональные антитела. В различных вариантах осуществления указанного способа одно или большее количество первичных антител включают моноклональные антитела.

[0085] В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает разделение белковых компонентов образца с двумя или большим количеством вариантов размера контаминирующих белков клетки-хозяина, представляющих интерес, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или даже более, контаминирующего белка (белков) клетки-хозяина, представляющего интерес, по молекулярной массе в одном или большем количестве капилляров с помощью капиллярного электрофореза. Типовой процесс приведен на Фиг. 6. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает иммобилизацию белковых компонентов образца в одном или большем

количестве капилляров. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с первым первичным антителом, которое специфически связывается с первым представляющим интерес моноклональным антителом. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает обнаружение связывания первого первичного антитела, тем самым обнаруживая первое представляющее интерес моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть создан профиль или отпечаток на основе молекулярной массы контаминирующего белка клетки-хозяина, например, только представляющего интерес контаминирующего белка клетки-хозяина для сравнения с профилем или отпечатком на основе молекулярной массы контаминирующих белков клетки-хозяина в смеси. Затем результаты этого сравнения можно учитывать для определения того, изменяется ли представляющий интерес контаминирующий белок клетки-хозяина в смеси, например, со временем или в процессе приготовления. Это может быть осуществлено для оптимизации условий приготовления, например, для минимизации эффектов или активности контаминирующих белков клетки-хозяина, которые могут присутствовать при приготовлении данного терапевтического mAb. Это сравнение профиля или отпечатка может быть выполнено для любого или всех контаминирующих белков клетки-хозяина, представляющих интерес, в смеси. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров со вторым первичным антителом, которое специфически связывается со вторым представляющим интерес моноклональным антителом. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает обнаружение связывания второго первичного антитела, тем самым обнаруживая второе представляющее интерес моноклональное антитело и различая контаминирующие белки клетки-хозяина в образце. Это действие можно проводить в дальнейшем для множества различных контаминирующих белков клетки-хозяина в образце. Например, в вариантах осуществления данного изобретения указанный способ может включать приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с третьим первичным антителом, которое специфически связывается с третьим контаминирующим белком клетки-хозяина, представляющим интерес, и обнаружение связывания третьего первичного антитела, тем самым обнаруживая представляющий интерес контаминирующий белок клетки-хозяина. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ может включать приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с одним или большим количеством дополнительных первичных антител, например, 4-м, 5-м, 6-м, 7-м и т. д. первичным антителом, которое специфически связывается с одним или большим количеством дополнительных контаминирующих белков клетки-хозяина, представляющих интерес, например, 4-м, 5-м, 6-м, 7-м и т. д. дополнительным контаминирующим белком (белками) клетки-хозяина, представляющих

интерес, и обнаружение связывания одного или большего количества дополнительных первичных антител, тем самым обнаруживая контаминирующий белок (белки) клетки-хозяина, представляющий интерес. В вариантах осуществления данного изобретения образец разделяют на множество капилляров, и каждый из этих капилляров приводят в контакт с другим первичным антителом или антителами и проводят обнаружение. Полученные сигналы можно позже объединить. В определенных вариантах осуществления данного изобретения обнаружение может происходить в одном капилляре, например, в мультиплексе.

[0086] В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает разделение белковых компонентов образца с двумя или большим количеством вариантов заряда контаминирующего белка клетки-хозяина, представляющего интерес, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или даже более, контаминирующего белка (белков) клетки-хозяина, представляющего интерес, по заряду в одном или большем количестве капилляров с помощью капиллярного электрофореза, например, с помощью изоэлектрического фокусирования. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает иммобилизацию белковых компонентов образца в одном или большем количестве капилляров. Типовой процесс приведен на Фиг. 8. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с первым первичным антителом, которое специфически связывается с первым представляющим интерес моноклональным антителом. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает обнаружение связывания первого первичного антитела, тем самым обнаруживая первое представляющее интерес моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть создан профиль или фингерпринт на основе заряда контаминирующего белка клетки-хозяина, например, только представляющего интерес контаминирующего белка клетки-хозяина для сравнения с профилем или фингерпринтом на основе заряда контаминирующих белков клетки-хозяина в смеси. Затем результаты этого сравнения можно учитывать для определения того, изменяется ли представляющий интерес контаминирующий белок клетки-хозяина в смеси, например, со временем или в процессе приготовления. Это может быть осуществлено для оптимизации условий приготовления, например, для минимизации эффектов или активности контаминирующего белка клетки-хозяина, который может присутствовать при приготовлении данного терапевтического mAb. Это сравнение профиля или фингерпринта может быть выполнено для любого или всех контаминирующих белков клетки-хозяина, представляющих интерес, в смеси. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров со вторым первичным антителом, которое специфически связывается со вторым представляющим интерес моноклональным антителом. В вариантах осуществления данного изобретения указанный способ включает обнаружение связывания второго первичного антитела, тем

самым обнаруживая второе представляющее интерес моноклональное антитело и различая контаминирующие белки клетки-хозяина в образце. Это действие можно проводить в дальнейшем для множества различных контаминирующих белков клетки-хозяина в образце. Например, в вариантах осуществления данного изобретения указанный способ может включать приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с третьим первичным антителом, которое специфически связывается с третьим контаминирующим белком клетки-хозяина, представляющим интерес, и обнаружение связывания третьего первичного антитела, тем самым обнаруживая представляющий интерес контаминирующий белок клетки-хозяина. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ может включать приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с одним или большим количеством дополнительных первичных антител, например, 4-м, 5-м, 6-м, 7-м и т. д. первичным антителом, которое специфически связывается с одним или большим количеством дополнительных контаминирующих белков клетки-хозяина, представляющих интерес, например, 4-м, 5-м, 6-м, 7-м и т. д. дополнительным контаминирующим белком (белками) клетки-хозяина, представляющих интерес, и обнаружение связывания одного или большего количества дополнительных первичных антител, тем самым обнаруживая контаминирующий белок (белки) клетки-хозяина, представляющий интерес. В вариантах осуществления данного изобретения образец разделяют на множество капилляров, и каждый из этих капилляров приводят в контакт с другим первичным антителом или антителами и проводят обнаружение. Полученные сигналы можно позже объединить. В определенных вариантах осуществления данного изобретения обнаружение может происходить в одном капилляре, например, в мультиплексе.

[0087] Образцы для применения в описанных способах могут быть гетерогенными, содержать множество компонентов, *то есть* могут содержать разные белки. В альтернативном варианте образец может быть гомогенным, содержать один компонент или по существу один компонент с множественным зарядом или молекулярной массой. Перед обнаружением представляющего интерес белка, такого как контаминирующий белок, можно выполнить доаналитическую обработку образца. Например, образец можно подвергнуть этапу лизирования, этапу денатурации, этапу нагревания, этапу очистки, этапу осаждения, этапу иммунопреципитации, этапу колоночной хроматографии, центрифугированию и т.д. иммобилизация может выполняться на нативных субстратах. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения разделение образца и иммобилизацию можно выполнять на нативных субстратах. В других вариантах осуществления данного изобретения образец может быть подвергнут денатурации, например, нагреванию и/или контакту с денатурирующим агентом. Денатурирующие агенты известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец может быть подвергнут воздействию невосстанавливающих условий. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец может быть

подвергнут воздействию восстанавливающих условий, например, контакту с одним или большим количеством восстанавливающих агентов. Восстанавливающие агенты известны в данной области техники.

[0088] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичные антитела помечены детектируемой меткой, и обнаружение связывания одного или большего количества первичных антител включает обнаружение детектируемой метки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения определение связывания одного или большего количества первичных антител включает приведение в контакт одного или большего количества первичных антител со вторичным антителом, которое специфически связывается по меньшей мере с одним из одного или большего количества первичных антител, а также обнаружение связывания вторичного антитела. В вариантах осуществления данного изобретения вторичное антитело имеет детектируемую метку, и детектируемую метку обнаруживают.

[0089] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичные антитела и/или вторичные антитела включают одну или большее количество детектируемых меток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная детектируемая метка включает хемилюминесцентную метку, флуоресцентную метку или биолуминесцентную метку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная детектируемая метка включает хемилюминесцентную метку. Хемилюминесцентная метка может включать любой элемент, который обеспечивает световой сигнал и который можно применять в соответствии с описанными в данном документе способами. В данной области техники известно множество таких хемилюминесцентных меток, см., например, патенты США №№ 6 689 576, 6 395 503, 6 087 188, 6 287 767, 6 165 800 и 6 126 870. Пригодные метки включают ферменты, способные реагировать с хемилюминесцентным субстратом таким образом, что индуцируется испускание фотонов за счет хемилюминесценции. Такие ферменты вызывают хемилюминесценцию в других молекулах за счет ферментативной активности. Такие ферменты могут включать пероксидазу, такую как пероксидаза хрена (HRP), бета-галактозидаза, фосфатаза или другие, для которых доступен хемилюминесцентный субстрат. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения хемилюминесцентная метка может быть выбрана из любого из множества классов люминольной метки, изолюминольной метки и т.д. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичные антитела включают хемилюминесцентные меченые антитела. Хемилюминесцентные субстраты хорошо известны в данной области техники, например, субстрат Galacton, доступный от компании Applied Biosystems, Фостер-Сити, штат Калифорния, или субстрат максимальной чувствительности SuperSignal West Femto (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity), доступный от компании Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, штат Иллинойс, или другие пригодные субстраты.

[0090] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения детектируемая метка включает биолуминесцентное соединение. Биолуминесценция представляет собой

тип хемилюминесценции, обнаруживаемый в биологических системах, в которых каталитический белок повышает эффективность хемилюминесцентной реакции. Присутствие биолуминесцентного соединения определяется путем обнаружения люминесценции. Пригодные биолуминесцентные соединения включают, помимо прочего, люциферин, люциферазу и экуорин.

[0091] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения детектируемая метка включает флуоресцентную метку, такую как флуоресцентный краситель. Флуоресцентный краситель может включать любой элемент, который обеспечивает флуоресцентный сигнал и который можно применять в соответствии с описанными в данном документе способами и устройствами. Обычно флуоресцентный краситель включает резонансно-делокализованную систему или ароматическую кольцевую систему, которая поглощает свет на первой длине волны и излучает флуоресцентный свет на второй длине волны в ответ на явление поглощения. В данной области техники известно большое количество таких молекул флуоресцентных красителей. Например, флуоресцентные красители могут быть выбраны из любого из множества классов флуоресцентных соединений, неограничивающие примеры которых включают ксантены, родамины, флуоресцеины, цианины, фталоцианины, скварины, красители bodipy, кумарины, оксазины и карбопиронины. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, например, когда первичные и/или вторичные антитела содержат флуорофоры, такие как флуоресцентные красители, их флуоресценция обнаруживается путем возбуждения их соответствующим источником света и мониторинга их флуоресценции с помощью детектора, чувствительного к характерной для них длине волны излучения флуоресценции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичные антитела включают антитела, меченные флуоресцентным красителем.

[0092] В вариантах осуществления данного изобретения с применением двух или большего количества различных первичных или вторичных антител, которые связываются или взаимодействуют с разными представляющими интерес белками, такими как разные представляющие интерес контаминантные белки, различные типы представляющих интерес белков могут быть обнаружены одновременно, например, в мультиплексном режиме внутри одного и того же или единственного капилляра, например, с применением другой или даже одной и той же детектируемой метки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения множественные первичные и/или вторичные антитела можно применять с множеством субстратов для обеспечения цветового мультиплексирования. Например, различные применяемые хемилюминесцентные субстраты должны быть выбраны так, чтобы они испускали фотоны разного цвета. Селективное обнаружение разных цветов может быть выполнено с помощью дифракционной решетки, призмы, серии цветных фильтров или других средств.

[0093] В вариантах осуществления данного изобретения капилляр может включать разделительную матрицу, которую можно добавлять автоматически с помощью

устройства и/или системы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец загружают в матрицу укладчика перед разделением. Разделительная матрица в одном варианте осуществления данного изобретения представляет собой разделительную матрицу по размеру и имеет аналогичные или по существу такие же свойства полимерного геля, применяемого в обычных методах электрофореза. Капиллярный электрофорез в разделительной матрице аналогичен разделению в полимерном геле, таком как полиакриламидный гель или агарозный гель, где молекулы разделяются в зависимости от размера молекул в образце, за счет обеспечения пористого прохода, по которому молекулы могут перемещаться. Разделительная матрица позволяет разделить молекулы по размеру молекул, поскольку более крупные молекулы будут проходить через матрицу медленнее, чем более мелкие молекулы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество капилляров содержат разделительную матрицу. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец, содержащий белок, представляющий интерес, разделяют или выделяют на основе молекулярной массы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения разделительная матрица включает просеивающую матрицу, сконфигурированную для разделения белков по молекулярной массе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белковые компоненты образца разделяют по молекулярной массе, и указанный способ представляет собой способ обнаружения и/или различения вариантов размера представляющего интерес моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образцы разделяют по молекулярной массе, и этот способ представляет собой способ обнаружения и/или различения вариантов размера контаминирующего белка, представляющего интерес.

[0094] В данной области техники известно большое количество твердофазных субстратов, например, гели, такие как полиакриламидный гель. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения выделение одного или большего количества белков, представляющих интерес, включает электрофорез образца в полимерном геле. Электрофорез в полимерном геле, таком как полиакриламидный гель или агарозный гель, разделяет молекулы в зависимости от их размера. Полимерный гель обеспечивает пористый канал, по которому могут перемещаться молекулы. Полимерные гели позволяют разделять молекулы в зависимости от размера молекул, поскольку более крупные молекулы будут проходить через гель медленнее, чем молекулы меньшего размера.

[0095] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец, содержащий белок, представляющий интерес, разделяют или выделяют на основе заряда компонентов образца. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белковые компоненты образца разделяют в зависимости от заряда, и указанный способ представляет собой способ обнаружения и/или различения вариантов заряда моноклонального антитела, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белковые компоненты образца разделяют по заряду,

и указанный способ представляет собой способ обнаружения и/или различения вариантов заряда контаминирующего белка, представляющего интерес. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения разделительная матрица содержит амфолиты-носители. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения разделение образца по заряду включает изоэлектрическое фокусирование (IEF) образца. Например, в электрическом поле молекула будет перемещаться к полюсу (катоду или аноду), который несет заряд, противоположный суммарному заряду, переносимому молекулой. Этот чистый заряд частично зависит от pH среды, в которой мигрирует молекула. Одной из распространенных электрофоретических процедур является создание растворов с разными значениями pH на каждом конце электрического поля с промежуточным диапазоном градиента pH. При определенном pH получается изоэлектрическая точка молекулы, и молекула не несет чистого заряда. Когда молекула пересекает градиент pH, она достигает точки, где ее суммарный заряд равен нулю (то есть ее изоэлектрической точки), и после этого она иммобилизуется в электрическом поле. Таким образом, эта процедура электрофореза разделяет молекулы в соответствии с их различными изоэлектрическими точками.

[0096] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, например, когда разделение осуществляется путем изоэлектрического фокусирования, амфолитный реагент может быть загружен в один или большее количество капилляров устройства для капиллярного электрофореза. Амфолитный реагент представляет собой смесь молекул, имеющих ряд различных изоэлектрических точек. Типовыми амфолитными реагентами являются Pharmalyte™ и Ampholine™, доступные от компании Amersham Biosciences, Бакингемшир, Англия.

[0097] В вариантах осуществления данного изобретения после завершения разделения компоненты отделенного образца (например, включая представляющие интерес белки, такие как представляющий интерес контаминирующий белок, иммобилизуют на стенке (стенках) одного или большего количества капилляров с помощью любого пригодного способа, включая, помимо прочего, химическую, фотохимическую и термическую обработку. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения компоненты отделенного образца иммобилизуют в одном или большем количестве капилляров SE-системы после разделения молекул с помощью электрофореза, например, по размеру или по заряду. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения иммобилизация включает фотоиммобилизацию, химическую иммобилизацию или термическую иммобилизацию. Иммобилизация может осуществляться посредством ковалентных связей или нековалентных процессов, таких как гидрофобное или ионное взаимодействие. В определенных вариантах осуществления данного изобретения представляющий интерес белок (белки) иммобилизуют с применением одного или большего количества реакционноспособных фрагментов. Реакционноспособный фрагмент может включать любую реакционноспособную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с соответствующей

реакционноспособной группой отдельных молекул образца. Таким образом, реакционноспособный фрагмент может включать любую реакционноспособную группу, известную в данной области техники, при условии, что она совместима с описанными в данном документе способами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения реакционноспособный фрагмент включает реакционноспособную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с соответствующей реакционноспособной группой белка, представляющего интерес, такого как контаминирующий белок, представляющий интерес.

[0098] Реакционноспособный фрагмент может быть присоединен к капилляру напрямую или опосредованно. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения реакционноспособный фрагмент может поставляться в растворе или суспензии и может образовывать мостики между стенкой капилляра и молекулами в образце после активации. Например, в одном варианте осуществления данного изобретения иммобилизация происходит путем воздействия на отделенный образец и капилляры ультрафиолетового (УФ) света, который служит для иммобилизации белка (-ов), представляющего интерес (если он присутствует в образце), и молекул в образце к стенкам капилляра. Иммобилизация может осуществляться посредством ковалентных связей или нековалентных процессов, таких как гидрофобное или ионное взаимодействие. В другом варианте осуществления данного изобретения реакционноспособный фрагмент можно применять для ковалентной иммобилизации выделенного представляющего интерес белка или представляющих интерес белков в капилляре. Реакционноспособный фрагмент может быть присоединен напрямую или опосредованно к капилляру (например, на стенку (стенки) капиллярной трубки). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения реакционноспособный фрагмент может поставляться в растворе или суспензии и может быть сконфигурирован для образования мостиков между стенкой капилляра и молекулами в образце после активации. Реакционноспособный фрагмент может выстилать капилляр или может присутствовать на линейном или поперечно-сшитом полимере в капилляре, который может быть связан или не связан со стенкой капилляра до и/или после активации. Реакционноспособный фрагмент может представлять собой и/или включать любую реакционноспособную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с соответствующей реакционноспособной группой отдельных молекул образца, например, как описано выше.

[0099] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения реакционноспособный фрагмент включает функциональную группу, которая может быть преобразована в функциональную группу, которая прикрепляется к представляющему интерес белку посредством гидрофобных взаимодействий, ионных взаимодействий, водородных связей и т.д. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие реакционноспособные фрагменты активируются УФ-светом, лазером, температурой или любым другим источником энергии, чтобы иммобилизовать представляющий интерес белок на поверхности капилляра и/или на поверхностях частиц, прикрепленных к

поверхности капилляра. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поверхности капилляра функционализированы термочувствительными полимерами, которые позволяют изменять гидрофобность поверхностей при изменении температуры. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляющие интерес белки иммобилизируют на таких поверхностях за счет увеличения гидрофобности термочувствительного полимера при достижении определенной температуры внутри капилляра.

[00100] В данной области техники известно большое количество реакционноспособных фрагментов, пригодных для ковалентного связывания двух молекул вместе. Например, реакционноспособный фрагмент может связываться со связями углерод-водород (C-H) белков. Поскольку многие среды для разделения также содержат компоненты со связями C-H, химический состав, который реагирует с сульфгидрильными (S-H) группами, может быть предпочтительным, поскольку группы S-H обнаруживаются в белках только по сравнению с большинством компонентов среды для разделения. Пригодные реакционноспособные группы включают, помимо прочего, фотореакционноспособные группы, химические реакционноспособные группы и термореакционноспособные группы. Фотоиммобилизация в капиллярной системе может быть достигнута путем активации одной или большего количества фотореакционноспособных групп. Фотореакционноспособная группа включает одну или большее количество латентных фотореакционноспособных групп, которые при активации внешним источником энергии образуют ковалентную связь с другими молекулами. См., например, патенты США №№ 5 002 582 и 6 254 634. Фотореакционноспособные группы при поглощении электромагнитной энергии генерируют активные частицы, такие как свободные радикалы и особенно нитрены, карбены, а также возбужденные формы кетонов. Можно выбрать фотореакционноспособные группы, которые реагируют на различные части электромагнитного спектра, например, на ультрафиолетовую, инфракрасную и видимую части спектра. Например, при воздействии источника света фотореакционноспособная группа может быть активирована с образованием ковалентной связи с соседней молекулой. Пригодные фотореакционноспособные группы включают, помимо прочего, арилкетоны, азиды, диазосы, диазирины, и хиноны. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения разделенные белки образца, представляющие интерес, иммобилизируют в капилляре СЕ-системы посредством изоэлектрического фокусирования.

[00101] Обнаружение детектируемой метки можно осуществлять с помощью любого способа, известного в данной области техники, при условии, что он совместим со способами, описанными в данном документе. Обнаружение метки можно выполнить путем мониторинга сигнала с помощью обычных способов и инструментов, неограничивающие примеры которых включают фотодетектор, матрицу фотодетекторов, матрицу устройств с заряженной связью (CCD) и т. д. Как правило, обнаружение детектируемой метки включает визуализацию капилляра. В некоторых вариантах

осуществления данного изобретения может быть визуализирована вся длина капилляра. В альтернативном варианте может быть визуализирована отдельная часть или фрагмент капилляра.

[00102] Специалисты в данной области техники легко смогут изменить порядок этапов для способов, описанных в данном документе. Например, образец можно разделить, а затем иммобилизовать представляющий интерес белок (белки) в их выделенных местах в капилляре до приведения в контакт представляющего интерес белка (белков) с первичными антителами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичные антитела приводят в контакт с представляющим интерес белком (белками) с образованием комплекса, а затем этот комплекс разделяют в капилляре СЕ-системы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первичные антитела можно предварительно загрузить в образец, а затем загрузить в систему. В качестве другого примера, этап разделения, такой как изоэлектрическое фокусирование, может быть применен после подачи хемилюминесцентных реагентов.

[00103] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец включает внутренний стандарт. Внутренние стандарты служат для калибровки разделения по изоэлектрической точке или молекулярной массе. Внутренние стандарты для IEF хорошо известны в данной области техники, например, см. публикацию Shimura, K., Kamiya, K., Matsumoto, H., and K. Kasai (2002) Fluorescence-Labeled Peptide pI Markers for Capillary Isoelectric Focusing, *Analytical Chemistry* v74: 1046-1053, и патент США № 5 866 683. Стандарты, которые должны быть обнаружены с помощью флуоресценции, могут быть иллюминированы либо до, либо после хемилюминесценции, но обычно не одновременно с хемилюминесценцией. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представляющий интерес белок и стандарты обнаруживают с помощью флуоресценции. Каждый представляющий интерес белок и стандарты могут быть помечены флуоресцентными красителями, каждый из которых может быть обнаружен на дискретных длинах волн излучения, так что представляющий интерес белок и стандарты могут быть обнаружены независимо.

[00104] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения внутренний стандарт может представлять собой очищенную форму самого представляющего интерес белка, которую обычно каким-либо образом делают отличимой от представляющего интерес белка. Способы получения очищенной формы представляющего интерес белка могут включать, помимо прочего, очистку от специфических свойств, очистку от организмов, выращенных в лаборатории (например, посредством химического синтеза), и/или тому подобное. Отличительной характеристикой внутреннего стандарта может быть любое пригодное изменение, которое может включать, помимо прочего, мечение красителем, радиоактивное мечение или модификацию подвижности стандарта во время электрофоретического разделения таким образом, чтобы он отделялся от представляющего интерес белка. Например, стандарт может содержать модификацию представляющего интерес белка, которая изменяет заряд, массу и/или длину (например,

посредством делеции, слияния и/или химической модификации) стандарта относительно представляющего интерес белка. Таким образом, представляющий интерес белок и внутренний стандарт могут быть помечены флуоресцентными красителями, каждый из которых может быть обнаружен на дискретных длинах волн излучения, в результате чего представляющий интерес белок и стандарты могут быть обнаружены независимо. В некоторых случаях внутренний стандарт отличается от представляющего интерес белка, но активность проявляет аналогичную или такую же, как и представляющий интерес белок, что позволяет проводить соответствующие сравнительные измерения. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения стандарт, который пригоден для применения, может быть любым из тех, что описаны в публикации заявки на патент США № 2007/0062813, описание которой в полном объеме включено в данный документ посредством ссылки.

[00105] Специалистам в данной области техники будет понятно, что можно осуществить практически любой способ загрузки образца в капилляр. Например, образец можно загрузить в один конец капилляра. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец загружают в один конец капилляра за счет гидродинамического потока. Например, в вариантах осуществления данного изобретения, в которых путь прохождения жидкости представляет собой капилляр, образец может быть загружен в один конец капилляра за счет гидродинамического потока, так что капилляр используется как микропипетка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения образец может быть загружен в капилляр с помощью электрофореза, например, когда капилляр заполнен гелем и, следовательно, более устойчив к гидродинамическому потоку.

[00106] Капилляр может включать любую структуру, которая позволяет жидкости или растворенным молекулам течь. Таким образом, капилляр может включать любую структуру, известную в данной области техники, при условии, что она совместима с описанными способами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения капилляр представляет собой отверстие или канал, по которому может течь жидкость или растворенная молекула. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения капилляр представляет собой проход в проницаемом материале, по которому могут течь жидкости или растворенные молекулы.

[00107] Капилляр включает любой материал, который позволяет обнаруживать представляющий интерес белок внутри капилляра. Капилляр включает любой удобный материал, такой как стекло, пластик, силикон, плавленый кварц, гель и т.п. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в указанном способе применяется множество капилляров. Множество капилляров позволяет одновременно анализировать несколько образцов.

[00108] Капилляр может различаться по размерам, ширине, глубине и поперечному сечению, а также по форме, например, быть закругленным, трапецевидным, прямоугольным и т. д. Капилляр может быть прямым, закругленным, змеевидным и т.п. Как описано ниже, длина пути прохождения жидкости частично зависит от таких

факторов, как размер образца и степень разделения образца, необходимого для разделения представляющего интерес белка.

[00109] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения капилляр включает трубку с отверстием. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в указанном способе применяется множество капилляров. Пригодные размеры капилляров включают, помимо прочего, капилляры с внутренним диаметром от около 10 до около 1000 мкм, хотя в более типовых случаях можно применять капилляры, имеющие внутренний диаметр от около 25 до около 400 мкм. В капиллярах меньшего диаметра применяются относительно малые объемы загрузки образца, в то время как применение капилляров с относительно большими отверстиями допускает относительно большие объемы загрузки образца и может привести к более эффективному обнаружению сигнала.

[00110] Капилляры могут иметь разную длину. Пригодная длина капилляров включает, помимо прочего, длину от около 2 до 20 см, хотя можно применять несколько более короткие и более длинные капилляры. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения длина капилляра составляет около 3, 4, 5 или 6 см. Более длинные капилляры обычно обеспечивают лучшее разделение и лучшее разложение сложных смесей на компоненты. Более длинные капилляры могут быть особенно полезны при разделении представляющих интерес малораспространенных белков.

[00111] Обычно капилляры состоят из плавленого кварца, хотя можно применять пластиковые капилляры и PYREX (т.е. аморфное стекло). Как отмечалось выше, капилляры не обязательно должны иметь круглую или трубчатую форму. Также могут применяться и другие формы, если они совместимы с описанными в данном документе способами.

[00112] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения капилляр может представлять собой канал. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в указанном способе применяется множество каналов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения капилляр может быть каналом в микрофлюидном устройстве. В микрофлюидном устройстве имеются каналы в подложке для выполнения самых разных операций. Микрофлюидные устройства могут включать один или множество каналов, сформированных в поверхности подложки. Микрофлюидное устройство может быть получено из твердой инертной подложки и в некоторых вариантах осуществления данного изобретения может быть в виде чипа. Размеры микрофлюидного устройства не являются критически важными, но в некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные размеры составляют от около 100 мкм до около 5 мм в толщину и от около 1 сантиметра до около 20 сантиметров по боковой поверхности. Каналы с пригодными размерами включают, помимо прочего, каналы, имеющие глубину от около 5 мкм до около 200 мкм, хотя в более типовых случаях можно применять канал с глубиной от около 20 мкм до около 50 мкм. Также

можно применять каналы меньшего размера, такие как микро- или наноканалы, если они совместимы с описанными в данном документе способами.

[00113] Хотя конкретные варианты осуществления данного изобретения были подробно описаны выше, данное описание приведено только с целью иллюстрации. Поэтому следует понимать, что многие аспекты, описанные выше, не предназначены в качестве требуемых или существенных элементов, если прямо не указано иное. Изменения и эквивалентные компоненты или действия, соответствующие описанным аспектам примеров вариантов осуществления данного изобретения, в дополнение к описанным выше, могут быть выполнены специалистом в данной области техники, учитывая преимущество данного изобретения, без отступления от сути и объема вариантов его осуществления, определенных в следующей формуле изобретения, объем которой должен получать самое широкое толкование, чтобы охватить такие модификации и эквивалентные структуры.

[00114] Далее приведены примеры, иллюстрирующие конкретные признаки некоторых вариантов осуществления данного изобретения. Однако конкретные признаки, описанные ниже, не должны рассматриваться как ограничения объема изобретения, а скорее как примеры, эквиваленты из которых будут признаны обычными специалистами в данной области техники.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Разработка антител к НСР для СЕ-вестерн

[00115] Коз и мышей иммунизировали с применением рекомбинантного PLBD2 или полосок НС для получения анти-PLBD2 pAb и mAb соответственно. Гибридомы скринировали на специфичность с помощью вестерн-блоттинга, и 10 были отобраны для очистки и биотинилирования. Зрелый белок PLBD2 (~ 42 кДа) не был обнаружен ни в одной из гибридом. Были идентифицированы антитела, нацеленные на N-конец. Фиг. 2 представляет собой набор цифровых изображений вестерн-блоттинга с применением выбранных препаратов антител анти-PLBD2. Фиг.3 представляет собой гистограмму, демонстрирующую измеренный уровень PLBD2 в образцах препаратов антител с различными комбинациями антител анти-PLBD2. Количество, измеренное с помощью ИФА, сравнивали с данными LC-MS. Из этих исследований были выбраны покрытие mAb09 и обнаружение биотинилированных козьих pAb для окончательного формата сэндвич-ИФА. Фиг. 4 представляет собой схематическое изображение сэндвич-ИФА с применением выбранных антител анти-PLBD2. Фиг. 5 представляет собой стандартную кривую, построенную для выбранного антитела анти-PLBD2 с применением метода ИФА.

Пример 2

Разделение и обнаружение с помощью СЕ-вестерн по размеру

[00116] Препарат антитела, который включал контаминант PLBD2, анализировали с помощью СЕ-вестерн на основе размера в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (см. Фиг. 7). На графике приведен зависимый от концентрации анализ PLBD2,

который демонстрирует, что СЕ-вестерн на основе размера сопоставим с измерением ИФА для обнаружения и количественной оценки контаминантов препаратов mAb. Кроме того, в отличие от ИФА, поскольку контаминирующие белки можно определить по молекулярной массе, существует возможность определить отдельные виды, вносящие вклад в общую контаминацию.

Пример 3

Разделение и обнаружение с помощью СЕ-вестерн по заряду

[00117] ППрепарат антитела, который включал контаминант PLBD2, анализировали с помощью СЕ-вестерн на основе заряда (см. Фиг. 9 и 10). На Фиг. 9 приведены результаты визуализированного анализа заряда сIEF-вестерн (icIEF). PLBD2 обнаруживается с помощью анти-PLBD2 pAb. PLBD2 отсутствует в процессе C2P2, и включение образца подтверждает, что СЕ-вестерн специфически улавливает пики PLBD2 в области 5-6. На Фиг. 10 приведены результаты визуализированного анализа заряда сIEF-вестерн (icIEF). Нативный PLBD2 можно увидеть в диапазоне рН 5-6 на фигуре справа. Это было обнаружено в процессе mAb, демонстрируя способность этого способа селективно обнаруживать PLBD2 из технологических образцов. В этом режиме заряда, можно применять специфические моноклональные антитела к PLBD2 для обнаружения технологического образца.

Объем данного изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами его осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеприведенного описания и сопроводительных фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обнаружения представляющих интерес белковых контаминантов в образце препарата антитела, включающий:

разделение белковых компонентов образца по физическому параметру в одном или большем количестве капилляров с помощью капиллярного электрофореза;

иммобилизацию белковых компонентов образца в одном или большем количестве капилляров;

приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с одним или большим количеством первичных антител, которые специфически связываются с представляющим интерес белковым контаминантом; а также

обнаружение связывания одного или большего количества первичных антител, тем самым обнаруживая представляющие интерес белковые контаминанты в образце препарата антитела.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий различение вариантов белковых контаминантов, представляющих интерес, в образце препарата антитела по физическому параметру.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что один или большее количество капилляров содержат разделительную матрицу.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что разделительная матрица содержит амфолиты-носители.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что физический параметр включает заряд.

6. Способ по п. 3, отличающийся тем, что разделительная матрица включает просеивающую матрицу, сконфигурированную для разделения белков по молекулярной массе.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что физический параметр включает молекулярную массу.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что одно или большее количество первичных антител метят детектируемой меткой, и при этом обнаружение связывания одного или большего количества первичных антител включает обнаружение детектируемой метки.

9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что обнаружение связывания одного или большего количества первичных антител включает:

приведение в контакт одного или большего количества первичных антител со вторичным антителом, которое специфически связывает по меньшей мере одно из одного или большего количества первичных антител, и при этом вторичное антитело имеет детектируемую метку; а также

обнаружение детектируемой метки.

10. Способ по любому из пп. 1-9, дополнительно включающий обнаружение и/или различение вариантов заряда или размера представляющих интерес белковых контаминантов.

11. Способ по любому из пп. 1-10, дополнительно включающий обнаружение относительного или абсолютного количества представляющих интерес белковых контаминантов.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что детектируемая метка включает хемилюминесцентную метку, флуоресцентную метку или биолуминесцентную метку.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что образец включает внутренний стандарт.

14. Способ по любому из пп. 1-13, отличающийся тем, что иммобилизация включает фотоиммобилизацию, химическую иммобилизацию или термическую иммобилизацию.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что одно или большее количество первичных антител включают поликлональные антитела.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что представляющие интерес белковые контаминанты включают PLBD2, CTSD, TIMP1, кислотную церамидазу (ASAH1), лизосомальную кислотную липазу (LAL), аннексин, катепсин В, антилейкопротеиназу (ALP) или их фрагменты.

17. Способ обнаружения и/или различения представляющих интерес белковых контаминантов в образце препарата антитела по физическому параметру, включающий:

разделение белковых компонентов образца по физическому параметру в одном или большем количестве капилляров с помощью капиллярного электрофореза;

иммобилизацию белковых компонентов образца в одном или большем количестве капилляров;

приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с первым первичным антителом, которое специфически связывается с представляющим интерес первым белковым контаминантом;

обнаружение связывания первого первичного антитела, тем самым обнаруживая первое представляющее интерес антитело.

приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров со вторым первичным антителом, которое специфически связывается с представляющим интерес вторым белковым контаминантом; а также

обнаружение связывания второго первичного антитела, тем самым обнаруживая представляющие интерес белковые контаминанты и различая антитела в образце.

18. Способ по п. 17, дополнительно включающий приведение в контакт белковых компонентов в одном или большем количестве капилляров с третьим первичным антителом, которое специфически связывается с представляющим интерес белковым контаминантом; а также

обнаружение связывания третьего первичного антитела, тем самым обнаруживая представляющий интерес третий белковый контаминант.

19. Способ по п. 18, дополнительно включающий приведение в контакт белковых

компонентов в одном или большем количестве капилляров с одним или большим количеством дополнительных первичных антителами, которые специфически связываются с одним или большим количеством дополнительных представляющих интерес белковых контаминантов;

обнаружение связывания одного или большего количества дополнительных первичных антител, тем самым обнаруживая представляющий интерес дополнительный белковый контаминант.

20. Способ по любому из пп. 17-19, дополнительно включающий различение вариантов белковых контаминантов, представляющих интерес, в образце препарата антитела по физическому параметру.

21. Способ по любому из пп. 17-20, отличающийся тем, что один или большее количество капилляров содержат разделительную матрицу.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что разделительная матрица содержит амфолиты-носители.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что физический параметр включает заряд.

24. Способ по п. 21, отличающийся тем, что разделительная матрица включает просеивающую матрицу, сконфигурированную для разделения белков по молекулярной массе.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что физический параметр включает молекулярную массу.

26. Способ по любому из пп. 17-25, отличающийся тем, что первичные антитела метят детектируемой меткой, и при этом обнаружение связывания первичных антител включает обнаружение детектируемой метки.

27. Способ по любому из пп. 17-26, отличающийся тем, что обнаружение связывания первичных антител включает:

приведение в контакт первичного антитела со вторичным антителом, которое специфически связывает первичные антитела, и при этом вторичное антитело имеет детектируемую метку; а также

обнаружение детектируемой метки.

28. Способ по любому из пп. 17-27, дополнительно включающий обнаружение относительного или абсолютного количества одного или более представляющих интерес белковых контаминантов.

29. Способ по любому из пп. 17-28, отличающийся тем, что детектируемая метка включает хемилюминесцентную метку, флуоресцентную метку или биолуминесцентную метку.

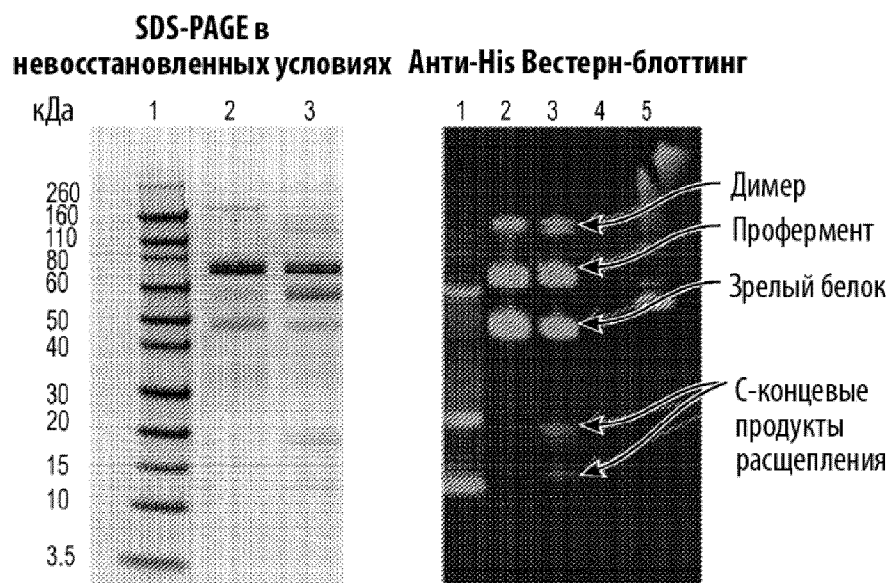
30. Способ по любому из пп. 17-29, отличающийся тем, что образец включает внутренний стандарт.

31. Способ по любому из пп. 17-30, отличающийся тем, что иммобилизация включает фотоиммобилизацию, химическую иммобилизацию или термическую иммобилизацию.

32. Способ по любому из пп. 17-31, отличающийся тем, что представляющие интерес белковые контаминанты включают PLBD2, CTSD, TIMP1, кислотную церамидазу (ASAH1), лизосомальную кислотную липазу (LAL), аннексин, катепсин В, антилейкопротеиназу (ALP) или их фрагменты.

По доверенности

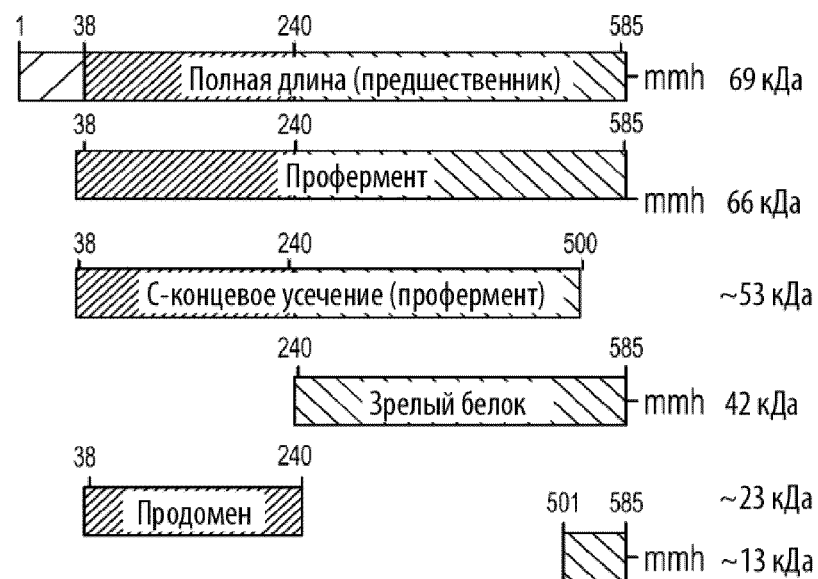
Фиг. 1А



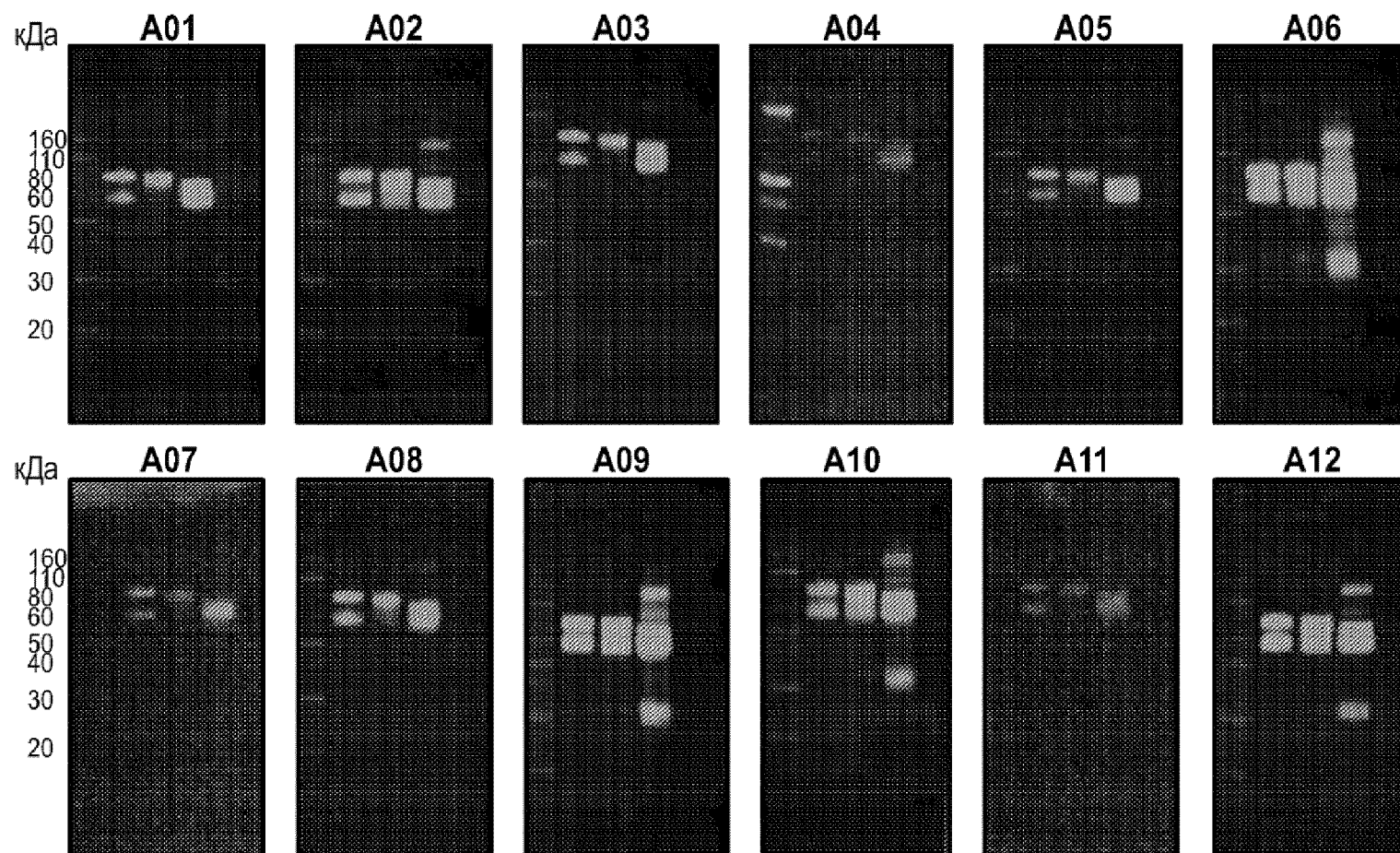
1. MW Стандарт
2. Рекombинантный PLBD2 хомяка (мелкий масштаб), 1 мкг
3. Рекombинантный PLBD2 хомяка (крупный масштаб), 1 мкг

Фиг. 1В

Предлагаемые молекулярные формы PLBD2 хомяка



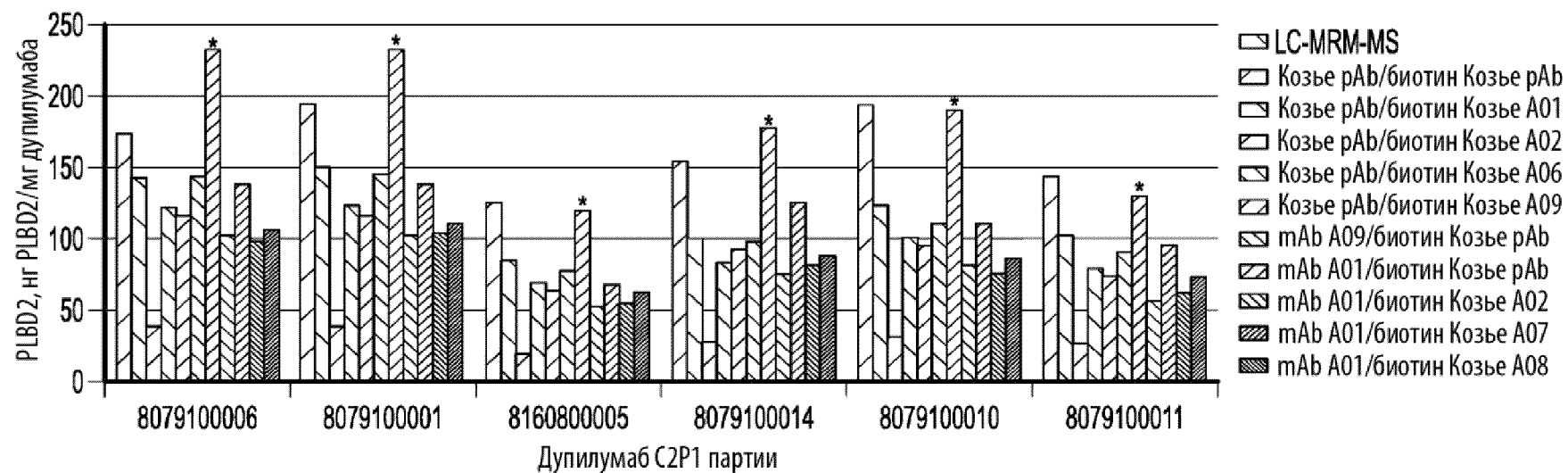
Фиг. 2



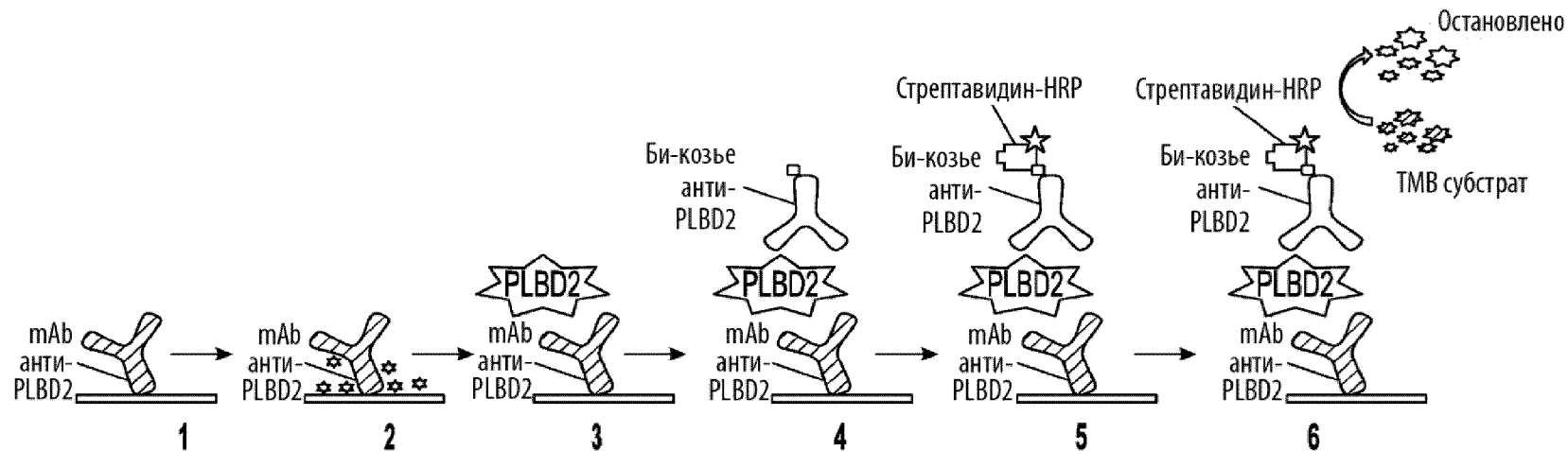
1. Рекombинантный PLBD2 хомьяка (мелкий масштаб), 250 нг
2. Рекombинантный PLBD2 хомьяка (крупный масштаб), 250 нг

3. НИС полоса образца, 5 мкг
4. PCSK9.mmh (mmh тэг контроль), 1 мкг

Фиг. 3

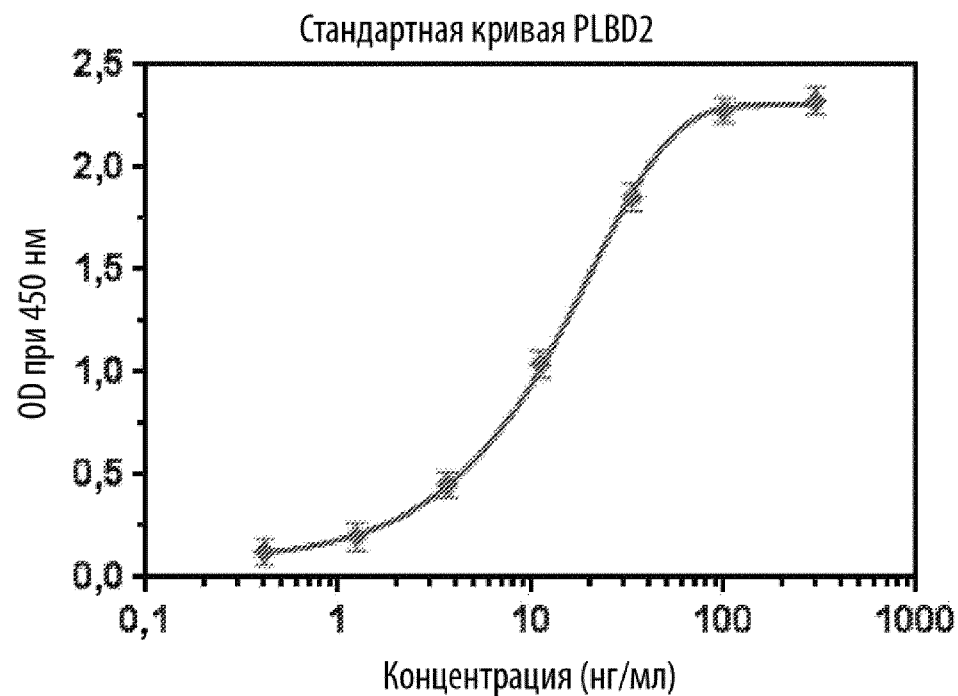


Фиг. 4



Этапы	1	2	3	4	5	6
Покрытие	Покрытие	Блокировка	Загрузка образцов	Обнаружение антител	Реагент для выявления	Реагент для обработки
Концентрация	2 мкг/мл мышинных анти- PLBD2 mAb	5% (v/v) BSA	Различная концентрация образца	1 мкг/мл биотинилированного козьего анти-PLBD2 pAb	1:60,000	0,5 N серная кислота
Время инкубации	В течение ночи	75 ± 15 мин	75 ± 15 мин	75 ± 15 мин	75 ± 15 мин	Останавливают, когда OD при 650 нм составляет 0,9-1,1

Фиг. 5



Диапазон линейности анализа: 1-64 нг/мл

Промежуточная точность: 17,9%

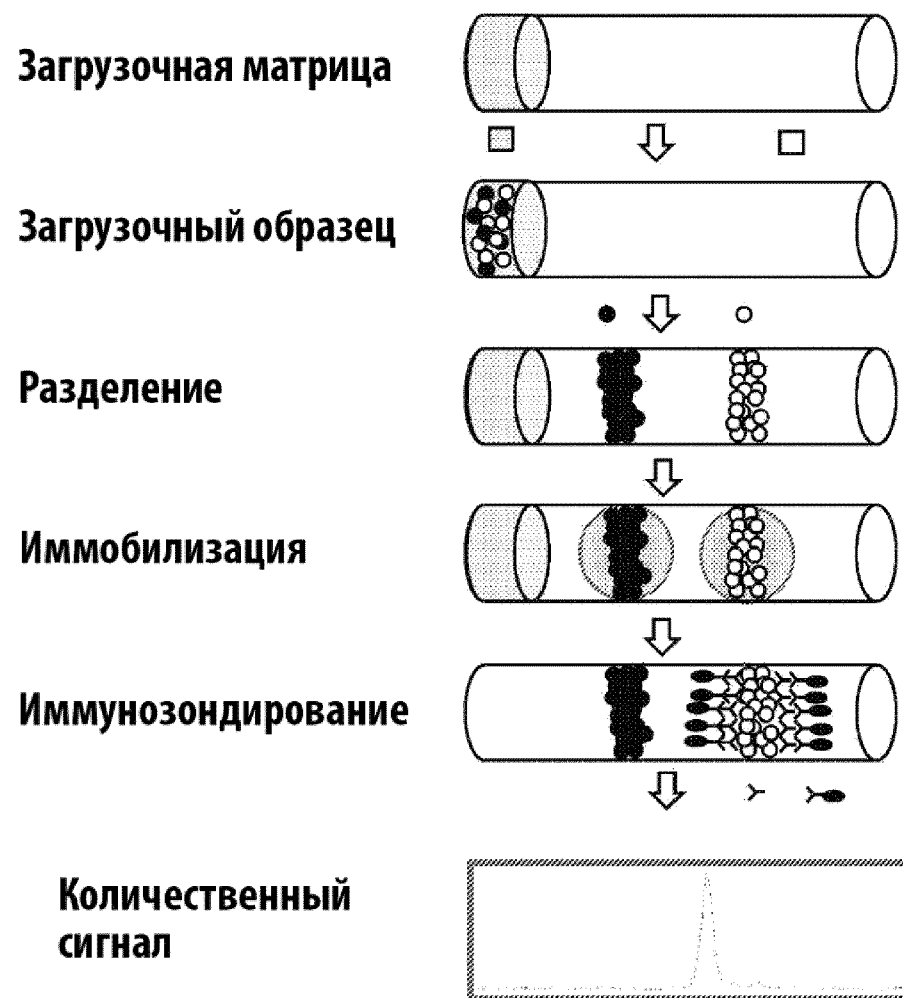
Матричный эффект: отсутствие интерференции матрицы
вплоть до 5 мг/мл Дупилумаба

LOQ: 1 нг/мл PLBD2

1 ppm при наличии 1 мг/мл mAb1

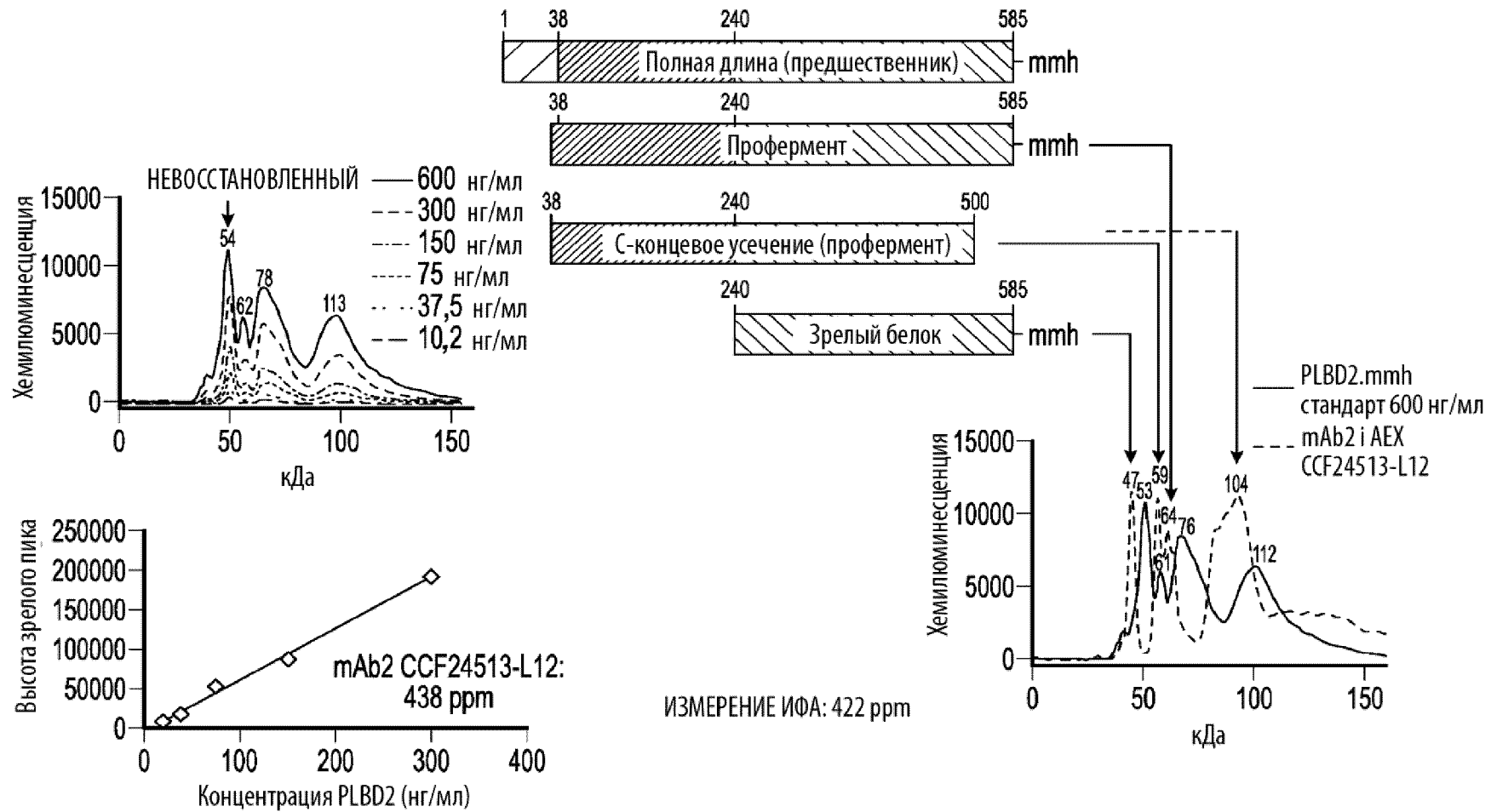
0,2 ppm при наличии 5 мг/мл mAb1

Фиг. 6

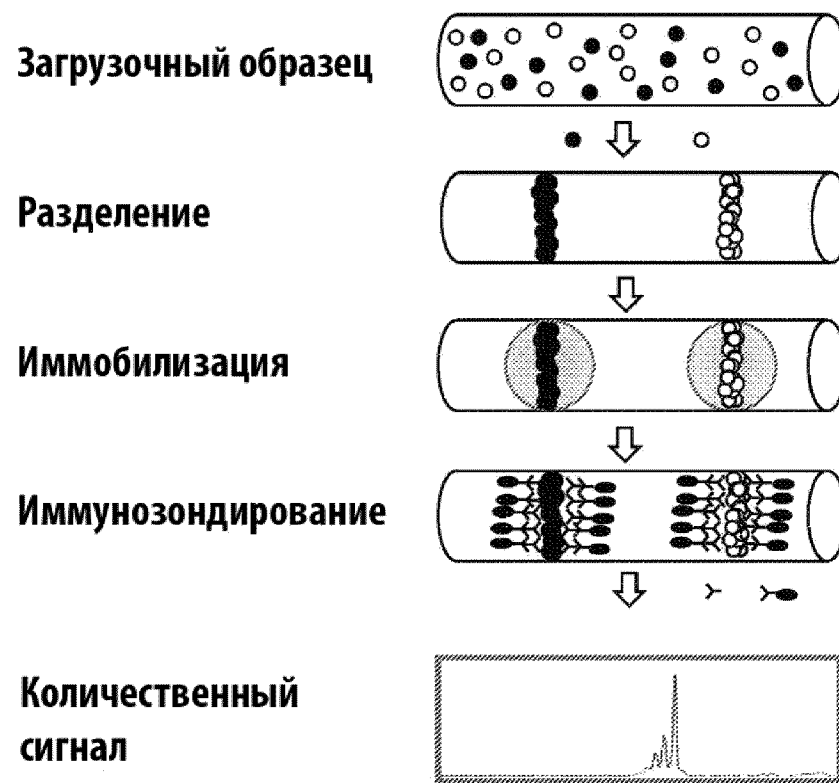


Анализ на основе размера

Фиг. 7

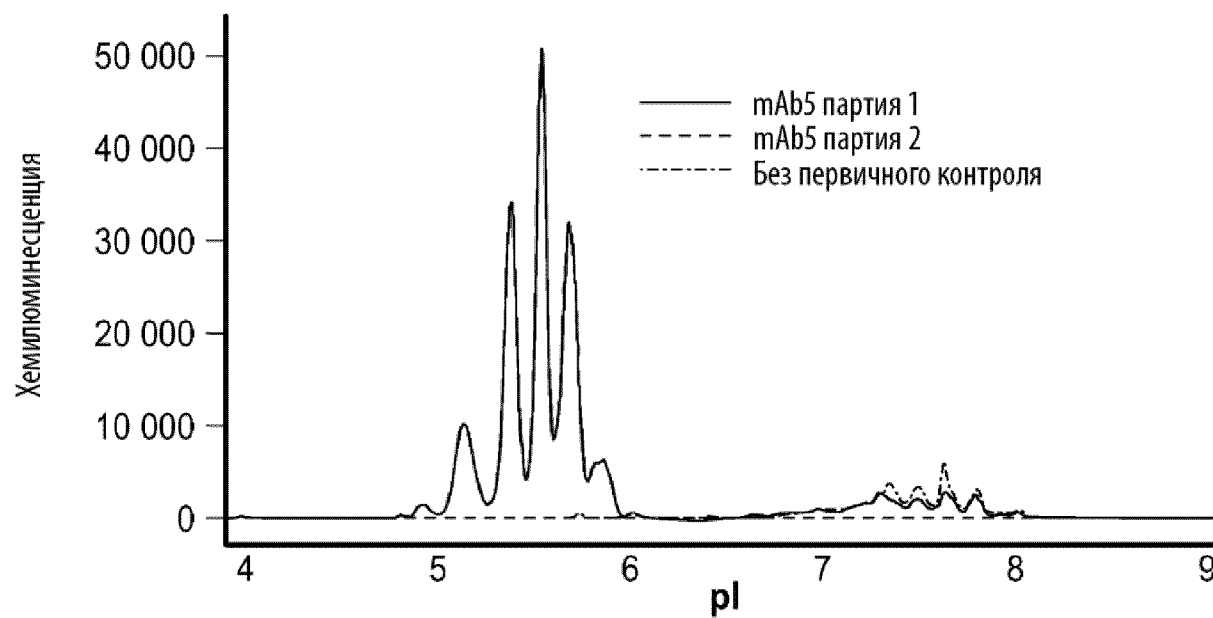


Фиг. 8



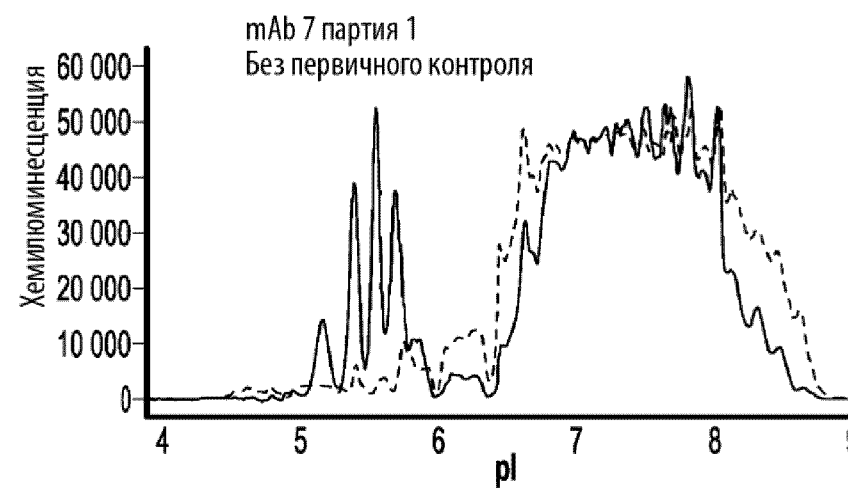
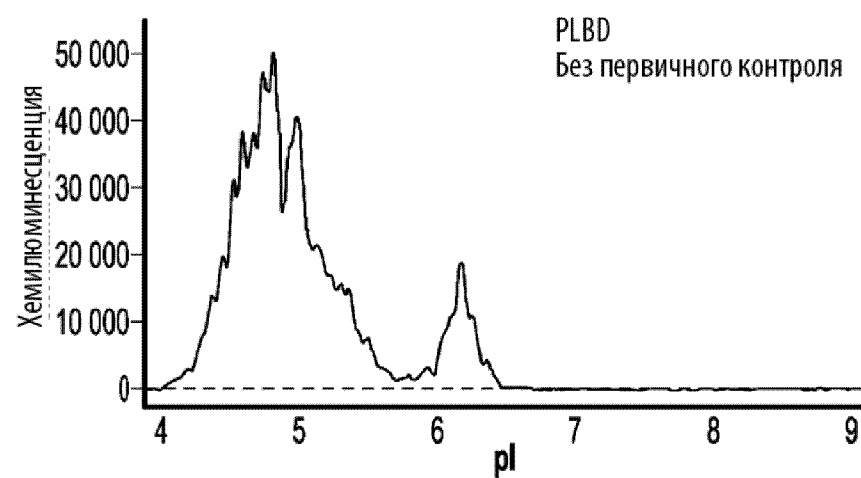
Анализ на основе заряда

Фиг. 9



Первичное: биотинилированное-pAb 1 (анти-PLBD2 pAb, продуцируемое у коз)
Обнаружение: стрептавидин-HRP

Фиг. 10



Первичное: козье анти-PLBD2 pAb
Обнаружение: анти-козье-HRP