



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월07일  
(11) 등록번호 10-2776242  
(24) 등록일자 2025년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/58 (2006.01) G01N 27/447 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
G01N 33/582 (2013.01)  
G01N 27/447 (2021.01)  
(21) 출원번호 10-2023-7019687(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2021년01월20일  
심사청구일자 2023년12월07일  
(85) 번역문제출일자 2023년06월12일  
(65) 공개번호 10-2023-0088853  
(43) 공개일자 2023년06월20일  
(62) 원출원 특허 10-2022-7027978  
원출원일자(국제) 2021년01월20일  
심사청구일자 2022년08월12일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/014111  
(87) 국제공개번호 WO 2021/150558  
국제공개일자 2021년07월29일  
(30) 우선권주장  
62/963,646 2020년01월21일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
WO2015184325 A2  
(뒷면에 계속)  
전체 청구항 수 : 총 31 항

(73) 특허권자  
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드  
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777  
(72) 발명자  
자오 위밍  
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내  
첸 헌터  
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인와이에스장

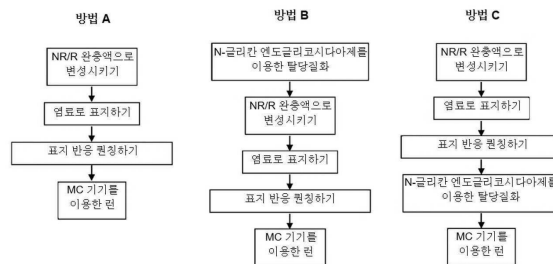
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 당질화된 단백질의 전기영동을 위한 탈당질화 방법

(57) 요약

본 개시는 번역 후 변형된 관심 단백질을 전기영동을 사용하여 분석하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 표지화 후 관심 단백질을 탈당질화하는 단계를 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

*G01N 33/68* (2013.01)

*G01N 2440/38* (2013.01)

(72) 발명자

**왕 샤오-춘**

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

**릴맨 티모시**

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

**까로 가브리엘**

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

**왕 워**

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

(56) 선행기술조사문헌

JP6416908 B2

WO2016069764 A1

US20190285580 A1

SHERRISSE KELLY BRYANT et al., LSU Doctoral  
Dissertations (2013)

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

관심 단백질을 포함하는 샘플을 분석하는 방법으로서, 관심 단백질은 Fc 도메인을 포함하며, 방법은

- a. 샘플을 변성시키는 단계;
- b. 샘플을 형광 표지로 표지하여 표지된 샘플을 생산하는 단계;
- c. 표지된 샘플에서 반응하지 않은 형광 표지를 퀀칭하는 단계;
- d. 표지된 샘플을 엔도글리코시다아제로 탈당질화하는 단계; 및
- e. 탈당질화 후에 표지된 샘플에 대해 전기영동을 수행하는 단계

를 포함하되,

샘플은 단계 (d)에서 탈당질화 전에, 단계 (a) 내지 (c)에서 변성되고, 표지되고, 퀀칭되는, 방법.

**청구항 2**

제1 항에 있어서, Fc 도메인은 인간 IgG1 Fc 도메인 또는 인간 IgG4 Fc 도메인인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 3**

제1 항에 있어서, 관심 단백질은 적어도 하나의 당질화 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 4**

제3 항에 있어서, 관심 단백질은 1 내지 8개의 N-연결된 당질화 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 5**

제1 항에 있어서, 관심 단백질은 적어도 하나의 부착된 글리칸을 포함하는 당질화된 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 6**

제1 항에 있어서, 관심 단백질은 항원 결합 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

제1 항에 있어서, 관심 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 8**

제7 항에 있어서, 수용체-Fc-융합 단백질은 트랩 단백질 또는 미니 트랩 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

제8 항에 있어서, 트랩 단백질은 IL-1 트랩 단백질, VEGF 트랩 단백질 또는 TNF 트랩 단백질인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제8 항에 있어서, 트랩 단백질은 릴로나셉트, 애플리버셉트, 및 에타너셉트로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

제1 항에 있어서, 관심 단백질은 압식시맵, 아달리무맵, 아달리무맵-아토, 아도-트라스트주맵, 알렘투주맵, 알리로쿠맵, 아테졸리주맵, 아벨루맵, 바실릭시맵, 벨리루맵, 벤탈리주맵, 베바시주맵, 베즐로톡주맵, 블리나투모맵, 브렌톡시맵 베도틴, 브로달루맵, 카나키누맵, 캄프로맵 펜테티드, 세톨리주맵 페골, 세미폴리맵, 세톡시맵, 데노수맵, 디뉴톡시맵, 두필루맵, 더발루맵, 에쿨리주맵, 엘로투주맵, 에미시주맵-kxwh, 엠탄신알리로쿠맵, 에비나쿠맵, 에볼로쿠맵, 파시누맵, 콜리루맵, 구셀쿠맵, 이브리투모맵 타이옥세탄, 이다루시주맵, 인플릭시맵, 인플릭시맵-abda, 인플릭시맵-dyyb, 이필리무맵, 익세키주맵, 메폴리주맵, 네시투무맵, 네스바쿠맵, 니볼루맵, 오빌톡사시맵, 오비누투주맵, 오크렐리주맵, 오파투무맵, 올라라투맵, 오말리주맵, 파니투무맵, 팬브롤리주맵, 퍼투주맵, 라무시투맵, 라니비주맵, 락시바쿠맵, 레스리주맵, 리누쿠맵, 리톡시맵, 사리루맵, 세쿠키누맵, 실톡시맵, 토실리주맵, 토실리주맵, 트라스투주맵, 트레보그루맵, 우스테키누맵, 및 베돌리주맵으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

제1 항에 있어서, 관심 단백질은 항-CD3 x 항-CD20 이중특이적 항체, 항-CD3 x 항-뮤신 16 이중특이적 항체, 및 항-CD3 x 항-전립선-특이적 막 항원 이중특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 이중특이적 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 13**

제5 항에 있어서, 적어도 하나의 부착된 글리칸은 N-연결되거나 O-연결된 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제1 항에 있어서, 관심 단백질은 유리 아민을 포함하고, 형광 표지는 관심 단백질에서 유리 아민에 공유 부착되는 아민-반응기를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제13 항에 있어서, 엔도글리코시다아제는 N-연결된 글리칸의 탈당질화를 촉매하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제1 항에 있어서, 엔도글리코시다아제는 펩티드-N-글리코시다아제 F (PNGase F), 엔도글리코시다아제 H (Endo H), 엔도글리코시다아제 S (Endo S), 엔도글리코시다아제 D, 엔도글리코시다아제 F1, 엔도글리코시다아제 F2 및 엔도글리코시다아제 F4로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제16 항에 있어서, PNGase F는 Rapid PNGase F인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제17 항에 있어서, Rapid PNGase F는 비환원성인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

제17 항에 있어서, 표지된 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 10분 동안 50°C로 가열하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

제1 항에 있어서, 표지된 샘플을 탈당질화하는 단계는 0.2-1.5 mg의 표지된 관심 단백질, 및 1-5 μL의 Rapid PNGase F를 10 μL의 반응 부피로 포함하되, 반응 부피에서 Rapid PNGase F의 부피는 제외되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 21**

제13 항에 있어서, 엔도글리코시다아제는 O-연결된 글리칸의 탈당질화를 촉매하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 22**

제21 항에 있어서, 엔도글리코시다아제는 Endo-  $\alpha$ -N-아세틸갈락토사미니다아제(0-글리코시다아제)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 23**

제1 항에 있어서, 변성된 샘플을 형광 표지로 표지하는 단계는 샘플을 35℃로 10-30분 동안 가열하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 24**

제1 항에 있어서, 샘플은 환원 용액 또는 비환원 용액을 사용하여 변성되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 25**

제24 항에 있어서, 환원 용액은 디티오프레이틸(DTT)을 포함하고, 비환원 용액은 요오드아세트아미드(IAM)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 26**

제1 항에 있어서, 샘플을 변성시키는 단계는 샘플을 50℃ 내지 99℃로 1분 내지 60분 동안 가열하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 27**

제1 항에 있어서, 미반응 형광 표지를 퀀칭하는 단계는 종결 용액을 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 28**

제1 항에 있어서, 탈당질화 후에 표지된 샘플과 병행하여 기준 표준을 분석하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 29**

제1 항에 있어서, 전기영동은 겔 전기영동, 등전점 전기영동, 모세관 전기영동(CE) 및 마이크로칩 모세관 전기영동(MCE)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 30**

제1 항 내지 제29 항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 20 kDa 미만의 범위에서 유리 염료 간섭을 감소시키고, 탈당질화 후에 표지된 샘플을 사용하여 생성된 전기영동도와 비교했을 때, 전기영동도에서 엔도글리코시다아제 피크를 감소시키거나 제거하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 31**

제30 항에 있어서, 엔도글리코시다아제 피크는 탈당질화 후에 표지된 샘플을 사용하여 생성된 전기영동도와 비교했을 때, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90%만큼 감소되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 32**

삭제

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**청구항 35**

삭제

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

**청구항 67**

삭제

**청구항 68**

삭제

**청구항 69**

삭제

**청구항 70**

삭제

**청구항 71**

삭제

**청구항 72**

삭제

**청구항 73**

삭제

**청구항 74**

삭제

**청구항 75**

삭제

**청구항 76**

삭제

**청구항 77**

삭제

**청구항 78**

삭제

**청구항 79**

삭제

**청구항 80**

삭제

**청구항 81**

삭제

**청구항 82**

- 삭제
- 청구항 83
- 삭제
- 청구항 84
- 삭제
- 청구항 85
- 삭제
- 청구항 86
- 삭제
- 청구항 87
- 삭제
- 청구항 88
- 삭제
- 청구항 89
- 삭제
- 청구항 90
- 삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**
- [0002] 본 출원은 2020년 1월 21일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/963,646호에 대한 우선권의 이익을 주장하며, 이의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.
- [0003] **기술분야**
- [0004] 본 개시는 생화학, 분자 생물학, 및 전기영동을 통한 단백질 분석에 관한 것이다.
- [0005] **참조에 의한 서열 목록의 통합**
- [0006] 본원에 전자적으로 제출된 텍스트 파일의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독 가능 포맷 사본(파일명: REGE-019-001WO\_SeqList\_ST25.txt, 기록일: 2020년 12월 22일, 파일 크기 1킬로바이트).

**배경 기술**

- [0007] 모세관 기반 전기영동(CE) 및 마이크로칩 기반 모세관 전기영동(MCE)은 제약 산업에서 단백질 크기에 기초하여 치료 단백질의 무결성 및 순도를 특성화하고, 품질 관리를 제공하는 데 사용되는 일반적인 분석 방법이다. 업계가 권장하는 표준 샘플 제조 방법은 많은 단백질에 효과가 있지만, 고도로 당질화된 단백질은 CE 및 MCE에 의한 충분히 분리되고 정량화될 수 없어서 문제가 된다. 또한, MCE 프로파일에서 부분적으로 당질화된 피크 및 비-당질화된 피크는 불순물 피크와 중첩될 수 있고 정량화를 방해할 수 있다. 따라서 당질화된 단백질로 작업할 때의 어려움을 극복할 수 있는 추가 샘플 제조 방법에 대한 필요성이 당업계에 존재한다. 본 발명은 CE 및 MCE와 같은 전기영동 방법에 의한 분석용 단백질을 제조하는 데 사용될 수 있는 고도로 당질화된 단백질을 표지하는 방

법을 제공한다.

**발명의 내용**

- [0008] 본 개시는 관심 단백질이 포함된 샘플을 분석하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 샘플을 변성시키는 단계, 형광 표지하는 단계, 퀀칭하는 단계, 및 탈당질화하는 단계를 포함하고; 여기서 변성시키는 단계, 표지하는 단계, 및 퀀칭하는 단계는 탈당질화 단계 전에 발생한다. 본 개시의 샘플을 분석하는 방법은 엔도글리코시다아제로 인한 전기영동도 피크를 감소시키거나 제거할 수 있고, 유리 염료 간섭을 감소시켜, 당단백질을 분석할 수 있는 신속하고, 정확하고, 고도로 재현 가능한, 고 처리량 방법을 제공할 수 있다.
- [0009] 본 개시는 관심 단백질이 포함된 샘플을 분석하는 방법을 제공하며, 상기 방법은: (a) 샘플을 변성시키는 단계; (b) 샘플을 형광 표지로 표지하여 표지된 샘플을 생산하는 단계; (c) 표지된 샘플에서 반응하지 않은 형광 표지를 퀀칭하는 단계; (d) 표지된 샘플을 엔도글리코시다아제로 탈당질화시키는 단계; 및 (e) 표지된 샘플에 대해 전기영동을 수행하는 단계를 포함하며; 여기서 샘플은 단계 (d)에서 탈당질화되기 전에 단계 (a) 내지 단계 (c)에서 변성되고, 표지되고, 퀀칭된다.
- [0010] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 관심 단백질은 적어도 하나의 당질화 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 당질화된 단백질이다. 일부 구현예에서, 당질화된 단백질은 적어도 하나의 부착된 글리칸을 포함한다. 일부 구현예에서, 당질화된 단백질의 총 중량의 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 또는 적어도 10%(10% w/w)는 글리칸을 포함한다.
- [0011] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 관심 단백질은 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 항체, 항체 단편, 또는 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 수용체 융합 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체 융합 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질 또는 가용성 TCR-Fc 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, 수용체 융합 단백질은 트랩 단백질 또는 미니 트랩 단백질이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 트랩 단백질 또는 미니 트랩 단백질이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 재조합 인간 단백질이다.
- [0012] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 당질화 부위는 Asn-X-Ser/Thr 컨센서스 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 부착된 글리칸은 N-연결된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 부착된 글리칸은 당질화된 단백질에서 아스파라긴에 N-연결된다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 N-연결된 글리칸의 탈당질화를 촉매한다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 펩티드-N-글리코시다아제 F(PNGase F), 엔도글리코시다아제 H(Endo H), 엔도글리코시다아제 S(Endo S), 엔도글리코시다아제 D, 엔도글리코시다아제 F1, 엔도글리코시다아제 F2, 및 엔도글리코시다아제 F4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 PNGase F이다. 일부 구현예에서, PNGase F는 Rapid PNGase F이다. 일부 구현예에서, Rapid PNGase F는 비-환원성이다. 일부 구현예에서, PNGase F는 환원성이다.
- [0013] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 약 35°C로 30분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 약 50°C로 10분 내지 30분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 약 50°C로 10분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 반응 혼합물을 포함하고, 반응 혼합물은 0.2~1.5 mg의 표지된 관심 단백질 및 1~5 μL의 Rapid PNGase F를 10 μL의 반응 부피로 포함하되, 반응 부피에서 Rapid PNGase F의 부피는 제외된다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 0.2 mg의 표지된 관심 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 5 μL의 Rapid PNGase F를 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 완충제를 포함한다.
- [0014] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 적어도 하나의 글리칸은 O-연결된 글리칸이다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 O-연결된 글리칸의 탈당질화를 촉매한다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 Endo-α-N-아세틸갈락토사미니다아제(O-글리코시다아제)를 포함한다.
- [0015] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 샘플을 형광 표지로 표지하는 단계는 샘플을 약 35°C로 10분 내지 30분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플을 형광 표지로 표지하는 단계는 샘플을 약 35°C로 15분 동안 가열하는 단계를 포함한다.
- [0016] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 샘플은 환원 용액을 사용해 변성된다. 일부 구현예에서, 환원 용액은 디티오트라이톨(DTT)을 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플은 비환원 용액을 사용해 변성된다. 일부 구현예에서, 비환

원 용액은 요오드아세트아미드(IAM)를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플을 변성시키는 단계는 샘플을 40℃ 내지 99℃로 1분 내지 5시간 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플을 변성시키는 단계는 샘플을 50℃ 내지 99℃로 1분 내지 60분 동안 가열하는 단계를 포함한다.

- [0017] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 미반응 형광 표지를 퀀칭하는 단계는 종결 용액을 첨가하는 단계를 포함한다.
- [0018] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 기준 표준을 샘플과 병행하여 분석하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0019] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 전기영동은 겔 전기영동, 등전점 전기영동, 모세관 전기영동(CE), 또는 마이크로칩 모세관 전기영동(MCE)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 전기영동은 MCE이다. 일부 구현예에서, MCE는 MCE 기기를 사용하여 수행된다.
- [0020] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 20 kDa 미만의 범위에서 유리 염료 간섭을 감소시키고, 탈당질화 후에 표지된 샘플을 사용하여 생성된 전기영동도와 비교했을 때, 전기영동도에서 엔도글리코시다아제 피크를 감소시키거나 제거한다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제 피크는 탈당질화 후에 표지된 샘플을 사용하여 생성된 전기영동도와 비교했을 때 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%만큼 감소된다. 일부 구현예에서, 탈당질화 후에 표지된 샘플을 사용하여 생성된 전기영동도와 비교했을 때, 전기영동도에서 엔도글리코시다아제 피크가 존재하지 않는다.
- [0021] 본 개시는 관심 단백질의 안정성을 결정하는 방법을 제공하며, 상기 방법은: (a) 관심 단백질이 포함된 샘플에 응력을 가하는 단계; (b) 관심 단백질이 포함된, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플을 변성시키는 단계; (c) 응력이 가해지 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플을 형광 표지로 표지하여 응력이 가해진 표지된 샘플 및 응력이 가해진 표지되지 않은 샘플을 생산하는 단계; (d) 응력이 가해진 표지된 샘플 및 응력이 가해지지 않은 표지된 샘플에서 미-반응 형광 표지를 퀀칭하는 단계; (e) 응력이 가해진 표지된 샘플과 응력이 가해지지 않은 표지된 샘플을 엔도글리코시다아제로 탈당질화하는 단계; (f) 응력이 가해진 표지된 샘플 및 응력이 가해지지 않은 표지된 샘플에 대해 마이크로칩 모세관 전기영동(MCE)을 수행하여 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플에 대한 전기영동도를 생성하는 단계; 및 (g) 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플의 전기영동도를 비교하여, 관심 단백질의 안정성을 결정하는 단계를 포함하며; 여기서 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플은 단계 (e)에서 탈당질화되기 전에 단계 (b) 내지 단계 (d)에서 변성되고, 표지되고, 퀀칭된다.
- [0022] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플에 열적 응력을 가하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플에 열적 응력을 가하는 단계는 샘플을 약 30℃ 내지 약 45℃에서 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 5주, 적어도 6주, 적어도 7주, 또는 적어도 8주 동안 유지시키는 단계를 포함한다.
- [0023] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 적어도 하나의 동결/해동 사이클을 포함한다.
- [0024] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플을 보과 조건에 노출시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 보관 조건은 약 -80℃ 내지 -30℃의 온도에서 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 8개월, 적어도 12개월, 적어도 18개월, 적어도 24개월, 또는 적어도 30개월 동안 보관하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 보관 조건은 약 2℃ 내지 8℃의 온도에서 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 8개월, 적어도 12개월, 적어도 18개월 동안 보관하는 것을 포함한다.
- [0025] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플에 기계적으로 교반하는 단계를 포함한다.
- [0026] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플을 동결건조시키고 재수화하는 단계를 포함한다.
- [0027] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플을 광, 방사선, 일중항 산소 중, 유리 라디칼, 높은 pH 조건 또는 낮은 pH 조건에 노출시키는 단계를 포함한다.
- [0028] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 관심 단백질은 적어도 하나의 당질화 부위를 포함한다. 일부 구현예에서,

관심 단백질은 당질화된 단백질이다. 일부 구현예에서, 당질화된 단백질은 적어도 하나의 부착된 글리칸을 포함한다. 일부 구현예에서, 당질화된 단백질의 총 중량의 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 또는 적어도 10%(10% w/w)는 글리칸을 포함한다. 일부 구현예에서, 당질화된 단백질의 총 중량의 적어도 10%(10% w/w)는 글리칸을 포함한다.

[0029] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 관심 단백질은 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 항체, 항체 단편, 또는 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 수용체 융합 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체 융합 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질 또는 가용성 TCR-Fc 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, 수용체 융합 단백질은 트랩 단백질 또는 미니 트랩 단백질이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 트랩 단백질 또는 미니 트랩 단백질이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 재조합 인간 단백질이다.

[0030] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 당질화 부위는 Asn-X-Ser/Thr 컨센서스 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 부착된 글리칸은 N-연결된다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 부착된 글리칸은 당질화된 단백질에서 아스파라긴에 N-연결된다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 N-연결된 글리칸의 탈당질화를 촉매한다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 펩티드-N-글리코시다아제 F(PNGase F), 엔도글리코시다아제 H(Endo H), 엔도글리코시다아제 S(Endo S), 엔도글리코시다아제 D, 엔도글리코시다아제 F1, 엔도글리코시다아제 F2, 및 엔도글리코시다아제 F4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 PNGase F이다. 일부 구현예에서, PNGase F는 Rapid PNGase F이다. 일부 구현예에서, Rapid PNGase F는 비-환원성이다. 일부 구현예에서, Rapid PNGase F는 환원성이다.

[0031] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 약 35°C로 30분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 약 50°C로 10분 내지 30분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 약 50°C로 10분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플을 탈당질화하는 단계는 각 샘플에 대한 반응 혼합물을 포함하고, 반응 혼합물은 0.2~1.5 mg의 표지된 관심 단백질 및 1~5 μL의 Rapid PNGase F를 10 μL의 반응 부피로 포함하되, 반응 부피에서 Rapid PNGase F의 부피는 제외된다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플 각각은 0.2 mg의 표지된 관심 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플 각각에 대한 반응 혼합물은 완충제를 포함한다.

[0032] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 적어도 하나의 글리칸은 O-연결된 글리칸이다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 O-연결된 글리칸의 탈당질화를 촉매한다. 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 Endo-α-N-아세틸갈락토사미니다아제(O-글리코시다아제)를 포함한다.

[0033] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플과 응력이 가해지지 않은 샘플을 형광 표지로 표지하는 단계는 각각의 샘플을 약 35°C로 30분 동안 가열하는 단계를 포함한다.

[0034] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플은 환원 용액을 사용하여 변성된다. 일부 구현예에서, 환원 용액은 디티오트레이톨(DTT)을 포함한다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플은 비환원 용액을 사용하여 변성된다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 요오드 아세트아미드(IAM)를 포함한다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플과 응력이 가해지지 않은 샘플을 변성시키는 단계는 샘플을 40°C 내지 99°C로 1분 내지 5시간 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플과 응력이 가해지지 않은 샘플을 변성시키는 단계는 샘플을 50°C 내지 99°C로 1분 내지 60분 동안 가열하는 단계를 포함한다.

[0035] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 미반응 형광 표지를 퀀칭하는 단계는 종결 용액을 첨가하는 단계를 포함한다.

[0036] 본 개시의 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플과 병행하여 기준 표준을 분석하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플과 응력이 가해지지 않은 샘플에 대한 전기영동도를 비교하는 단계는 피크 수, 높이, 위치, 면적, 또는 이들의 조합을 비교하는 단계를 포함한다.

**도면의 간단한 설명**

[0037]

도 1은 탈당질화 단계를 포함하지 않는 방법 A에 대한 프로토콜; 표지하는 단계 전에 탈당질화 단계를 포함하는 방법 B에 대한 프로토콜; 및 표지하는 단계 후에 탈당질화 단계를 포함하는 방법 C에 대한 프로토콜을 보여주는 도면이다. NR: 비환원, R: 환원, MC: 마이크로칩 모세관 전기영동.

도 2는 탈당질화 단계를 포함되지 않는 프로토콜(방법 A, 적색으로 표시됨) 및 단백질을 표지하는 단계 전에 탈당질화 단계를 포함하는 프로토콜(방법 B, 청색으로 표시됨)을 사용하여 비환원 조건 하에 단백질 1을 사용하여 생성된 전기영동도이다. 수치 피크 표지는 마이크로칩 모세관 전기영동(MCE)에 의해 측정했을 때의 단백질의 분자량을 나타낸다. Rapid PNGase F (PNGase) 피크는 표시된 전기영동도에 나타난다.

도 3은 방법 B(표지화하는 단계 전에 탈당질화 단계 포함)를 사용하여 비환원 조건 하에 단백질 1을 사용하여 생성된 3개의 전기영동도를 보여준다. 분석 전에 단백질 1 샘플을 37°C에서 0시간 동안(0, 적색, 상단), 2주 동안(청색, 중간), 또는 4주 동안(흑색, 하단) 열 응력을 가하여 처리하였다. 저 분자량 1 피크(LMW 1) 피크는 응력이 가해짐에 따라 증가하였고, PNGase 피크와 병합되었다.

도 4는 탈당질화 단계를 포함되지 않는 프로토콜(방법 A, 적색으로 표시됨) 및 단백질을 표지하는 단계 후에 탈당질화 단계를 포함하는 프로토콜(방법 B, 청색으로 표시됨)을 사용하여 환원 조건 하에 단백질 1을 사용하여 생성된 전기영동도이다. 수치 피크 표지는 MCE에 의해 측정했을 때의 단백질의 분자량을 나타낸다. 방법 B의 전기영동도에서의 PNGase F 피크는 표시된 것과 같다. 회색 음영 박스는 유리 염료 피크를 나타낸다.

도 5는 단백질 1로 생성된 전기영동도 쌍이며, 여기서 단백질 1은 표지 후 탈당질화되었다(방법 C). 상단: 50°C에서 10, 15, 20, 및 30분 동안 1 µL의 Rapid™ PNGase로 탈당질화 반응을 수행하였다. 하단: 50°C에서 10, 15, 20, 및 30분 동안 2 µL의 Rapid™ PNGase로 탈당질화 반응을 수행하였다.

도 6은 방법 C 및 단백질 1을 사용하여 생성된 전기영동도로서, 50°C에서 10분 동안 유지된 반응에서 1, 2, 3, 또는 4 µL의 Rapid™ PNGase F로 탈당질화한 결과를 보여준다. 삽도는 불안정하게 탈당질화된 단백질 1 피크(주 피크의 우상단)를 나타내며, 화살표는 Rapid™ PNGase의 양이 증가함에 따라 당질화된 단백질이 감소하는 것을 나타낸다. 유리 염료 피크는 회색 음영 박스로 표시되어 있다. MP, 주 피크; LMW 1, 저 분자량 1 피크.

도 7은 방법 C(표지 후 탈당질화) 및 단백질 1을 사용하여 생성된 4개의 일련의 전기영동도이며, 여기서 단백질 1은 1, 2, 3, 또는 4 µL의 Rapid™ PNGase로 탈당질화한 것이다(위에서 아래 방향). 저 분자량(LMW) 피크 1-5, 주 피크(MP), 및 고 분자량 피크(HMW)가 표시되어 있다.

도 8은 37°C에서 4주 동안 단백질을 유지함으로써 열적 응력을 가한 단백질 1(37C 4w, 흑색) 및 응력을 가하지 않은 단백질 1(t=0, 적색)을 사용해 방법 C(표지 후 탈당질화)로 생성한 전기영동도이다. 탈당질화는 Rapid™ PNGase F를 사용하여 수행하였다.

도 9는 단백질 2를 사용하여 생성된 전기영동도로서, 비환원 조건 하에 탈당질화와 함께 표지된 단백질 2(방법 C)와 탈당질화 없이 표지된 단백질 2(방법 A)를 비교한 것이다. PNGase F의 예상 크기는 37 KDa이며, 이 피크는 존재하지 않는다. 유리 염료 피크는 음영 박스로 표시되어 있다.

도 10은 단백질 3을 사용하여 생성된 전기영동도로서, 비환원 조건 하에 표지 후 탈당질화 처리한 단백질 3(청색, 방법 C)과 탈당질화 처리하지 않은 단백질 3(적색, 방법 A)을 비교한 것이다. 수치 피크 표지는 MCE에 의해 측정된 단백질 및 단백질 단편의 분자량을 나타낸다.

도 11은 환원 조건 하에 표지 후 탈당질화 처리한 단백질 3(청색, 방법 C)과 탈당질화하지 않은 단백질 3(적색, 방법 A)을 비교한 전기영동도이다. 수치 피크 표지는 MCE에 의해 측정된 단백질 및 단백질 단편의 분자량을 나타낸다.

도 12는 탈당질화하지 않은 단백질 4(방법 A, 적색)와 표지 후 탈당질화한 단백질 4(방법 C, 청색)를 비교한 전기영동도이다. 단백질 4는 비환원(NR) 조건을 사용하여 변성시켰다. 수치 피크 표지는 MCE에 의해 측정된 분자량을 나타낸다. LMW: 저 분자량; DGMP: 탈당질화된 주 피크; GMP: 당질화된 주 피크. 유리 염료 피크는 음영 박스로 표시되어 있다.

도 13은 탈당질화 없이 표지된 단백질 4(방법 A, 적색)와 표지 후 탈당질화한 단백질 4(방법 C, 청색)를 비교한 전기영동도이다. 단백질 4는 환원(R) 조건을 사용하여 변성시켰다. LC: 경쇄; DHC: 탈당질화된 중쇄; GHC: 당질화된 중쇄. 유리 염료 피크는 음영 박스로 표시되어 있다.

도 14는 비환원 조건 하에 방법 C 및 단백질 1을 사용하여 생성된 단백질의 안정성에 광-응력이 미치는 영향을 분석한 3개의 전기영동도를 보여준다. 단백질 1을 쿨 화이트(CW) 형광 램프 광에 120만 렉스 시간(MLH) 동안 누적 노출시키고(청색, 중간) 2.4 MLH 동안 누적 노출시켜(흑색, 하단) 광 응력을 가한 다음, 응력이 가해지지 않은 단백질 1(적색, 상단)과 비교하였다. 탈당질화는 Rapid™ PNGase F를 사용해 수행하였다. LMW: 저 분자량; MP: 주 피크; HMW: 고 분자량.

도 15는 비환원 조건 하에 방법 C 및 단백질 1을 사용하여 생성된 단백질의 안정성에 광-응력이 미치는 영향을 분석한 3개의 전기영동도를 보여준다. 단백질 1을 200 와트시/평방미터(청색, 중간) 및 400 와트시/평방미터(흑색, 하단)의 통합된 근자외선(UVA) 에너지 하에 광 응력을 가한 다음, 응력을 가하지 않은 단백질 1(적색, 상단)과 비교하였다. 탈당질화는 Rapid™ PNGase F를 사용해 수행하였다. LMW: 저 분자량; MP: 주 피크; HMW: 고 분자량.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0038] 본 개시는 전기영동을 통해 분석하기 위한 관심 단백질이 포함된 샘플을 제조하기 위한 새로운 방법을 제공한다. 본원에서 제공된 방법에서, 관심 단백질을 변성시키고, 이어서 형광 염료를 사용하여 단백질을 공유 표지하고, 이어서 표지 반응을 퀀칭시킨다. 표지화 후, 표지된 단백질을 엔도글리코시다아제 같은 효소와 접촉시켜 추가 정제 없이 관심 단백질로부터 글리칸을 제거한다. 전기영동을 위한 당질화된 단백질을 제조하는 이전의 방법(표지화 전에 단백질을 탈당질화하는 방법)과 달리, 본원에 기술된 방법은 질량에 기초하여 단백질과 펩티드 중을 명확하게 분리할 수 있다. 이들 방법은 또한, 마이크로칩 전기영동(MCE) 전기영동도에서 탈당질화에 사용된 효소에 의한 간섭을 제거하고, 표지 반응에서 염료를 제거한다. 상기 방법은 신속하고, 고도로 재현 가능한, 고 처리량 방법이며, 당질화된 단백질을 분석하는데 성공적으로 사용되어 왔다. 이론에 구속되지 않음이 없이, 본원에 기술된 방법은 고도로 당질화된 단백질과 관련하여 유리한 것으로 여겨지는데, 이는 고도의 당질화가 MCE 또는 모세관 전기영동(CE) 분석 플랫폼에서 단백질의 이동을 방해하여, 단백질 분자량의 측정의 정확도를 낮추고, 전기영동도 피크의 정밀도를 떨어뜨리기 때문이다. 본원에 기술된 방법은, CE 및 MCE와 같은 방법에 의해 분석되는 임의의 당질화된 단백질에 적용 가능한 플랫폼 접근법에 사용될 수 있고, 단백질을 특성화하는데 사용되거나 품질 관리를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기술된 방법은 관심 단백질이 다양한 조건(예컨대 다양한 온도에서의 장기간 유지하는 것)을 거치거나 상이한 제형으로 제조될 때 관심 단백질의 안정성을 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0039] 따라서, 본 개시는 전기영동을 사용해 분석하기 위한 관심 단백질이 포함된 샘플을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 (a) 샘플을 변성시키는 단계; (b) 샘플을 형광 표지로 표지하여 표지된 샘플을 생산하는 단계; (c) 표지된 샘플에서 반응하지 않은 형광 표지를 퀀칭하는 단계; (d) 표지된 샘플을 엔도글리코시다아제로 탈당질화시키는 단계; 및 (e) 표지된 샘플에 대해 전기영동을 수행하는 단계를 포함하며, 여기서 샘플은 단계 (d)에서 탈당질화 전에 단계 (b) 및 (c)에서 표지되고 퀀칭된다. 일부 구현예에서, 전기영동은 마이크로칩 모세관 전기영동(MCE)이고, 출력은 전기영동도이다.

[0040] 정의

[0041] 현재 청구된 발명을 설명하는 맥락에서 (특히 청구범위의 맥락에서) 단수형(“a”, “an”, “the” 및 유사한 지시어)의 사용은, 본원에서 달리 표시되거나 문맥상 명확히 반대로 표시되지 않는 한, 단수형과 복수형 모두를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0042] 본원에서 값의 범위에 대한 인용은, 본원에서 달리 표시되지 않는 한, 그 범위 내에 속하는 각각의 별도의 값을 개별적으로 참조하는 속기법으로서 역할을 하도록 의도된 것뿐이며, 각각의 별도의 값은 본원에서 개별적으로 인용된 것처럼 명세서에 포함된다.

[0043] 용어 “약”의 사용은 대략 +/-10% 범위에서 언급된 값의 위 또는 아래의 값을 설명하기 위한 것이며; 다른 실시예들에서는 상기 값은 대략 +/-5% 범위에서 언급된 값의 위 또는 아래의 값에 이를 수 있으며; 다른 실시예들에서는 상기 값은 대략 +/-2% 범위에서 언급된 값의 위 또는 아래의 값에 이를 수 있으며; 다른 실시예들에서는 상기 값은 대략 +/-1% 범위에서 언급된 값의 위 또는 아래의 값에 이를 수 있다. 선행하는 범위들은 문맥상 명확해지게 하기 위한 것이며, 어떠한 추가 제한도 함축되지 않는다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, “단백질”은 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 지칭한다. 단백질은 폴리펩티드 및 펩티드를 포함하고, 또한 당질화, 지질 부착, 황화, 글루탐산 잔기의 감마-카르복실화, 알킬화, 하이드록실화 및 ADP-리보실화와 같은 변형을 포함할 수 있다. 단백질은 단백

질-기반 약물을 포함하여, 과학적 또는 상업적 관심 대상이 될 수 있으며, 단백질은 특히 효소, 리간드, 수용체, 항체 및 키메라 또는 융합 단백질을 포함한다. 단백질은 주지의 세포 배양 방법을 사용하여 다양한 유형의 재조합 세포에 의해 생산되며, 일반적으로 유전자 조작 기술(예를 들어, 키메라 단백질을 인코딩하는 서열, 또는 코돈 최적화된 서열, 인트론리스 서열 등)에 의해 세포 내로 도입되며, 여기서 에피솜으로서 채취할 수도 있고 세포의 계층 내에 혼입될 수도 있다.

[0045] 본원에 기술된 모든 방법은 본원에서 달리 표시되지 않거나 문맥상 명확히 반박되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공되는 임의의 그리고 모든 실시예, 또는 예시적인 언어(예를 들어, "예컨대")의 사용은, 단지 본 발명을 더욱 잘 조명하기 위한 것이고, 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범주에 대한 한정 을 제시하지 않는다. 본 명세서 내의 어떠한 언어도 본 발명의 실시예 필수적인 것으로서 임의의 미-청구 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0046] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 마치 각각의 개별 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 구체적으로 그리고 개별적으로 참조로서 통합되도록 표시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로서 통합된다.

[0047] **변성**

[0048] 본 개시는 샘플에서 관심 단백질을 변성시키는 방법을 제공한다. 단백질을 변성시키는 것은 펩티드 결합을 파괴 하기에 충분하지 않은 조건 하에 2차 및 3차 단백질 구조를 파괴하여 1차 구조를 온전하게 남기는 것을 포함한다.

[0049] 환원 및 비환원 조건 모두에서 관심 단백질을 변성시키는 방법은 본 개시의 범주에 포함된다.

[0050] 단백질 환원제는 이황화 결합을 파괴하는 제제이다. 이들 이황화 결합은 단일 폴리펩티드 내에 있거나, 별도의 폴리펩티드 상에서 암호화된 단백질의 다수의 서브유닛 사이에 있을 수 있다. 서브유닛 간의 이황화 결합을 파괴하면 개별적으로 분석해야 할 다중-서브유닛 단백질의 개별 서브유닛을 분석할 수 있다. 환원제는 당업자에게 공지되어 있을 것이다. 예시적인 환원제는 디티오프레이톨(DTT, CAS 3483-12-3), 베타-메르캅토에탄올(BME, 2BME, 2-ME, b-mer, CAS 60-24-2), 2-아미노에탄티올(시스테인-HCl로도 불리는 2-MEA-HCl, CAS 156-57-0), 트리스(2-카복시에틸) 포스핀 염산염(TCEP, CAS 5961-85-3), 시스테인 염산염(Cys-HCl, CAS 52-89-1), 또는 2-메르캅토에탄설폰산 나트륨염(MESNA)을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 단백질 결합을 환원시키기 위한 다른 방법, 예컨대 펩티드 및 단백질 이황화 결합의 고상 환원이 가능하도록 티올계 환원제가 고정화된 수지를 함유하는 고정화된 환원제 컬럼 등이 당업계에 공지되어 있다. 산화제를 포함하여, 폴리펩티드 간의 화학적 상호작용을 환원시키는 데 적합한 환원제도 고려된다.

[0051] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 환원 용액을 사용해 변성된다. 일부 구현예에서, 환원 용액은 135 내지 155 mM의 디티오프레이톨(DTT)을 함유한다. 일부 구현예에서, 환원 용액은 인산나트륨 및 도데실 황산리튬을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 환원 용액은 0.69%의 도데실 황산리튬(LDS), 69 mM 인산나트륨, 및 142 mM 디티오프레이톨을 포함하거나 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 환원 용액은 40~120 mM DTT, 40~80 mM 인산나트륨, 및 0.5% 내지 2.0% LDS를 함유한다. 일부 구현예에서, 환원 용액은 60~100 mM DTT, 50~70 mM 인산나트륨, 및 0.75% 내지 1.5% LDS를 함유한다. 일부 구현예에서, 환원 용액은 80 mM DTT, 약 60 mM 인산나트륨, 및 약 1.2% LDS를 함유한다. 일부 구현예에서, 환원 용액은 관심 단백질이 포함된 샘플에 약 1:4 부피%의 비율로 첨가된다.

[0052] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 비환원 용액을 사용하여, 즉 관심 단백질 내 이황화 결합을 보존하는 조건 하에서 변성된다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 요오드아세트아미드(IAM)를 포함한다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 100 내지 200 mM 요오드아세트아미드를 포함한다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 인산나트륨 및 도데실 황산리튬(LDS)을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 166 mM 요오드아세트아미드(IAM)를 포함한다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 166 mM 요오드아세트아미드, 0.81%의 도데실 황산리튬(LDS), 및 81 mM 인산나트륨을 포함하거나 본질적으로 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 100~300 mM 요오드아세트아미드, 40~80 mM 인산나트륨, 및 0.5% 내지 2.0% LDS를 함유한다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 150~250 mM 요오드아세트아미드, 50~70 mM 인산나트륨, 및 0.75% 내지 1.5% LDS를 함유한다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 약 200 mM 요오드아세트아미드, 약 60 mM 인산나트륨, 및 약 1.2% LDS를 함유한다. 일부 구현예에서, 비환원 용액은 관심 단백질이 포함된 샘플에 약 1:4 부피%의 비율로 첨가된다.

[0053] 일부 구현예에서, 샘플을 변성시키는 단계는 샘플에 환원 용액 또는 비환원 용액을 첨가하는 단계, 및 환원 용액 또는 비환원 용액과 혼합된 샘플을 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플은 열에 의해

변성된다. 예를 들어, 환원 용액 또는 비환원 용액과 합쳐진 샘플은 30℃ 내지 99℃, 30℃ 내지 90℃, 30℃ 내지 80℃, 30℃ 내지 70℃, 30℃ 내지 60℃, 30℃ 내지 50℃, 30℃ 내지 40℃, 40℃ 내지 99℃, 40℃ 내지 90℃, 40℃ 내지 80℃, 40℃ 내지 70℃, 40℃ 내지 60℃, 40℃ 내지 50℃, 50℃ 내지 99℃, 50℃ 내지 90℃, 50℃ 내지 80℃, 50℃ 내지 70℃, 또는 50℃ 내지 60℃로 가열될 수 있다. 일부 구현예에서, 환원 용액 또는 비환원 용액과 합쳐진 샘플은 1분 내지 12시간, 1분 내지 10시간, 1분 내지 5시간, 1분 내지 4시간, 1분 내지 3시간, 1분 내지 2분 내지, 1분 내지 60분, 1분 내지 30분, 1분 내지 15분, 1분 내지 10분, 1분 내지 5분, 5분 내지 60분, 5분 내지 30분, 5분 내지 15분, 5분 내지 10분, 10분 내지 60분, 10분 내지 45분, 10분 내지 30분 내지, 또는 10분 내지 15분 동안 가열될 수 있다. 일부 구현예에서, 환원 용액 또는 비환원 용액과 합쳐진 샘플은 1분 내지 60분 동안 40℃ 내지 99℃로 가열될 수 있다. 일부 구현예에서, 환원 용액 또는 비환원 용액과 합쳐진 샘플은 1분 내지 60분 동안 50℃ 내지 99℃로 가열될 수 있다. 추가의 예로서, 환원 용액 또는 비환원 용액과 합쳐진 샘플은 5분 내지 30분 동안 60℃ 내지 85℃로 가열될 수 있다. 대안적으로, 환원 용액 또는 비환원 용액과 합쳐진 샘플은 10분 동안 75℃로 가열할 수 있다. 일부 구현예에서, 환원 용액 또는 비환원 용액과 합쳐진 샘플은 10분 동안 70℃로 가열된다.

[0054] **탈당질화**

[0055] 본 개시는 샘플에서 관심 단백질을 탈당질화하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 본원에 기술된 방법을 사용하여 형광 표지로 표지된 후 탈당질화된다. 탈당질화는 엔도글리코시다아제와 같은 효소를 사용하여 수행될 수 있다.

[0056] 당단백질은 아미노산 측쇄에 공유 부착된 올리고당 사슬(글리칸)을 함유하는 단백질이다. 이들 올리고당 사슬은 공변적 변형 또는 변형 후 변형 시에 단백질에 부착된다.

[0057] 본원에서 사용되는 바와 같이, 때때로 “다당류” 및 “올리고당류”와 상호 교환적으로 사용되는 “글리칸”이라는 용어는 당질 결합된 다당류를 포함하거나 이로 이루어진 화합물을 지칭한다. 글리칸이라는 용어는, 탄수화물이 다당류인 경우에도, 당단백질 또는 당지질에 연결된 탄수화물을 지칭하도록 사용될 수도 있다. 글리칸은 다당류의 O-글리코시드 결합을 포함할 수 있다. 글리칸은 다당류의 동중중합체 또는 이중중합체일 수 있고, 선형 또는 분지형일 수 있다. 예시적인 글리칸은 특히 만노오스, N-아세틸글루코사민(GlcNAc), N-글리코실뉴라민산(Neu5Gc), 갈락토오스, 시알산, 및 푸코오스의 단량체를 포함할 수 있다.

[0058] 글리칸은 N-연결 또는 O-연결을 통해 관심 단백질에 연결될 수 있고, 관심 단백질은 N-연결된 글리칸, O-연결된 글리칸, 또는 N-연결된 글리칸과 O-연결된 글리칸의 조합을 포함할 수 있다. 본원에서 지칭되는 바와 같이, “N-연결된 글리칸” 또는 “N-연결된 당질화”는 당 단량체 또는 다당류를 단백질의 아스파라긴(Asn) 아미노산의 아미드 질소와 같은 질소 원자에 부착시키는 것을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, “O-연결된 글리칸” 또는 “O-연결된 당질화”는 당 단량체 또는 다당류를 단백질의 세린(Ser) 또는 트레오닌(Thr) 아미노산의 산소 원자에 부착시키는 것을 지칭한다. 예시적인 O-연결된 글리칸은 O-N-아세틸갈락토사민(O-GalNAc), O-N-아세틸글루코사민(O-GlcNAc), O-만노오스, O-갈락토오스, O-푸코오스, 및 O-글루코오스를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0059] 엔도글리코시다아제는 올리고당에서 내부 글리코시드 결합을 가수분해하는 효소이다. 올리고당이 당단백질의 일부인 경우, 올리고당은 엔도글리코시다아제에 의해 당단백질로부터 방출된다.

[0060] 본원에서 사용되는 바와 같이, “엔도글리코시다아제”는 당단백질 또는 당지질로부터 글리칸을 방출하는 효소를 지칭한다. 엔도글리코시다아제는 말단 잔기가 아닌 잔기들 사이에서 다당류 변화를 절단할 수 있으므로, 이들의 동족 단백질 접합체로부터 장쇄 탄수화물을 방출할 수 있다. 예시적인 엔도글리코시다아제는 펩티드-N-글리코시다아제 F (PNGase F), 엔도글리코시다아제 H (Endo H), 엔도글리코시다아제 S (Endo S), 엔도글리코시다아제 D, 엔도글리코시데아제 F1, 엔도글리코시다아제 F2, 엔도글리코시다아제 F3, O-글리코시다아제, 및 엔도-β-갈락토시다아제를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0061] 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 N-연결된 글리칸의 탈당질화를 촉매한다. N-연결된 글리칸을 표적으로 하는 예시적인 엔도글리코시다아제는 펩티드-N-글리코시다아제 F(PNGase F), 엔도글리코시다아제 H(Endo H), 엔도글리코시다아제 S(Endo S), 엔도글리코시다아제 D, 엔도글리코시다아제 F1, 엔도글리코시다아제 F2, 및 엔도글리코시다아제 F4를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 관심 단백질이 N-연결된 글리칸을 포함하는 이들 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 PNGase F이다.

[0062] 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 O-연결된 글리칸의 탈당질화를 촉매한다. O-연결된 글리칸을 표적으로

하는 예시적인 엔도글리코시다아제는 Endo- $\alpha$ -N-아세틸갈락토사미니다아제(O-글리코시다아제)를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0063] 일부 구현예에서, 엔도글리코시다아제는 PNGase F이다. PNGase F는 N-연결 당단백질에서 고 만노오스, 하이브리드, 및 복합 올리고당류의 최대측 N-아세틸-D-글루코사민(GlcNAc) 잔기와 아스파라긴 잔기 사이를 절단하는 아미다아제이다. 일부 구현예에서, PNGase F는 재조합이다. 일부 구현예에서, PNGase F는 Rapid™ PNGase F이다. Rapid™ PNGase F는 당업계에 공지되어 있고, New England Biolabs 및 다른 벤더로부터 입수 가능하다. 일부 구현예에서, Rapid™ PNGase F는 관심 단백질에서 이황화 결합을 보존하는 비환원 포맷이다. 일부 구현예에서, Rapid™ PNGase F는 관심 단백질에서 이황화 결합을 보존하지 않는 환원 포맷이다.

[0064] 일부 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 0.1 내지 3.0 mg의 표지된 관심 단백질이 포함된 반응 혼합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 0.1 내지 2.0 mg의 표지된 관심 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 0.1 내지 1.5 mg의 관심 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 0.5 내지 1.5 mg의 관심 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 0.2 mg의 표지된 관심 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 1 내지 7  $\mu$ L의 Rapid™ PNGase F 효소를 10  $\mu$ L의 반응 부피로 포함하되, 여기서 효소의 부피는 제외된다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 1 내지 5  $\mu$ L의 Rapid™ PNGase F 효소를 10  $\mu$ L의 반응 부피로 포함하되, 여기서 효소의 부피는 제외된다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 표지된 관심 단백질이 포함된 10  $\mu$ L 부피에 첨가된 1  $\mu$ L, 2  $\mu$ L, 3  $\mu$ L, 4  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, 6  $\mu$ L, 또는 7  $\mu$ L의 Rapid™ PNGase F 효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 5  $\mu$ L의 Rapid™ PNGase F 효소를 10  $\mu$ L의 반응 부피로 포함하되, 여기서 효소의 부피는 제외된다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 표지된 관심 단백질이 포함된 10  $\mu$ L 부피에 첨가된 5  $\mu$ L의 Rapid™ PNGase F 효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 추가 완충제, 예를 들어 PNGase F 효소의 작용을 용이하게 하는 반응 완충제를 포함한다. 일부 구현예에서, 반응 혼합물은 추가 완충제를 포함하지 않는다.

[0065] 일부 구현예에서, 예를 들어 엔도글리코시다아제가 PNGase F인 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 25°C 내지 65°C로 100 내지 60분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 30°C 내지 50°C로 20분 내지 40분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 35°C로 30분 동안 가열하는 단계를 포함한다.

[0066] 일부 구현예에서, 예를 들어 엔도글리코시다아제가 Rapid™ PNGase F인 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 50°C에서 10 내지 30분 동안 가열하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플을 탈당질화하는 단계는 샘플을 50°C로 10분 동안 가열하는 단계를 포함한다.

[0067] **단백질 표지화**

[0068] 본 개시는 관심 단백질을 표지하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 탈당질화 전에 표지된다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 형광 염료와 같은 형광 표지로 표지된다. 임의의 적절한 표지가 본 개시의 범위 내에 포함되는 것으로서 고려된다.

[0069] 본원에서 사용되는 바와 같이, “검출 가능한 표지” 또는 “표지”는 관심 단백질과 같은 표적 물질의 식별 및/또는 정량화를 용이하게 하기 위해 사용되는 화학물질을 지칭한다. 예시적인 표지는 직접적으로 관찰 또는 측정되거나 간접적으로 관찰 또는 측정될 수 있는 표지를 포함한다. 이러한 표지는 방사선 계수 장치로 측정할 수 있는 방사성 표지; 육안으로 관찰되거나 분광광도계로 측정할 수 있는 안료, 염료, 또는 다른 색소원; 광전자 증배체-기반 기기에 의해 측정될 수 있는 화학발광 표지, 또는 스핀 표지 분석기로 측정될 수 있는 사진 필름 스핀 표지; 출력 신호가 적절한 분자 부가물의 여기에 의해 생성되고, 염료에 의해 흡수되는 광에 의한 여기에 의해 육안으로 보이거나 표준 형광계 또는 이미징 시스템으로 측정될 수 있는 형광 모이머를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 표지는 인광체(phosphor) 또는 형광원(fluorogen)과 같은 발광 물질; 생물발광 물질; 출력 신호가 신호 화합물의 화학적 변형에 의해 생성되는 화학발광 물질; 금속 함유 물질; 또는 신호의 효소 의존성 2차 생성이 발생하는 효소, 예컨대 무색 기질로부터 착색된 생성물이 형성되거나 적절한 전구체로부터 자발적으로 화학발광 생성물이 형성되는 효소일 수 있다. 표지(label)란 용어는 또한, 표지된 분자가 후속하여 첨가될 때 검출 가능한 신호를 생성하는 데 이 표지된 분자가 사용될 수 있도록, 표지된 분자에 선택적으로 결합하는 “태그” 또는 합텐을 지칭할 수 있다.

- [0070] 다수의 표지는 당업자에 의해 알려져 있으며, 극미립자; 형광 염료; 합텐; 효소 및 이의 색소원성, 형광원성, 및 화학발광 물질; 및 Richard P. Haugland의 문헌[Molecular Probes Handbook Of Fluorescent Probes And Research Chemicals 제6판, (1996)] 및 1999년 11월과 2001년 5월에 CD 롬으로 각각 발간된 동 문헌의 제7 및 제8 개정판(그 내용은 참조로서 통합됨), 및 기타 공개된 출처에 기술된 기타 표지를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다: .
- [0071] 예시적인 형광 표지는 형광 염료를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, “형광 염료”는 광을 흡수하고 더 긴 파장에서 이를 방출하는 비-단백질 분자를 지칭한다. 예시적인 형광 염료는 Alexa Fluor® 염료, 플루오레세인 이소-티오시아네이트(FITC), 테트라메틸 로다민 이소-티오시아네이트(TRITC), DyLight 형광체, Cy 염료, IRDyes, HiLyte 염료, 설폰화 및/또는 PEG화된 쿠마린 염료, 설폰화 및/또는 PEG화된 시아닌 염료, 및 설폰화 및/또는 PEG화된 피렌 염료를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0072] 추가적인 검출 가능한 표지는 Dyomics DY-631 NHS 에스테르를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 사용될 수 있는 다른 검출 가능한 표지는 다른 염료, 형광단, 발색단, 질량 태그, 양자점 등, 및 미국 특허 제6,924,372호 (그 전체가 참조로서 통합됨)에 개시된 것들을 포함한다.
- [0073] 예시적인 형광 표지는 녹색 형광 단백질과 같은 생물학적 형광단, 및 양자점과 같은 나노규모 결정을 또한 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0074] 추가의 예시적인 형광 표지는 Pico 단백질 시약 키트(Protein Pico Assay Reagent Kit, 품번 760498로도 지칭됨)의 일부로서 Perkin Elmer로부터 입수 가능하다. 일부 구현예에서, 형광 표지는 Perkin Elmer Pico 표지 염료를 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질을 표지하는 단계는 관심 단백질이 포함된 샘플에 4~20 μM의 Pico 염료 용액을 약 1:1 부피의 비율로 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질을 표지하는 단계는 관심 단백질이 포함된 샘플에 4 μM, 5 μM, 6 μM, 10 μM, 12 μM, 14 μM, 15 μM, 16 μM, 18 μM, 20 μM, 또는 25 μM의 Pico 염료 용액을 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, Pico 염료 용액은 관심 단백질이 포함된 샘플에 부피 기준 약 1:5의 염료 대 샘플, 부피 기준 1:4의 염료 대 샘플, 부피 기준 1:3의 염료 대 샘플, 부피 기준 1:2의 염료 대 샘플, 부피 기준 1:1의 염료 대 샘플, 부피 기준 2:1의 염료 대 샘플, 부피 기준 3:1의 염료 대 샘플, 부피 기준 4:1의 염료 대 샘플, 또는 부피 기준 5:1의 염료 대 샘플의 비율로 첨가된다. 일부 구현예에서, 관심 단백질을 표지하는 단계는 관심 단백질이 포함된 샘플에 16 μM의 Pico 염료 용액을 약 1:1 부피의 비율로 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 샘플과 염료를 가열하는 단계를 포함한다.
- [0075] 일부 구현예에서, 형광 표지 또는 염료는 관심 단백질에 공유 부착된다. 일부 구현예에서, 형광 표지는 아민-반응기를 포함하고, 관심 단백질에서 유리 아민에 공유 부착된다. 일부 구현예에서, 표지는 고친화도 상호작용을 통해 관심 단백질에 비공유 부착된다.
- [0076] 단백질 표지를 위한 추가의 적절한 키트는 당업자에게 알려져 있을 것이다. 예시적인 키트는 MedChemExpress의 항체/단백질 표지 키트-FITC, 및 (Fast) Alexa Fluor® 접합 키트를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0077] 공유 부착된 임의의 형광 표지, 및 형광 표지를 부착하는 임의의 방법은 본 발명의 방법의 범위 내에 포함된 것으로서 고려된다.
- [0078] 일부 구현예에서, 샘플 및 염료는 약 30°C 내지 40°C로 약 5 내지 40분 동안 가열된다. 일부 구현예에서, 샘플 및 염료는 약 30°C 내지 40°C로 약 5분, 약 10분, 약 15분, 약 20분, 약 25분, 약 30분, 약 35분, 또는 약 40분 동안 가열된다. 일부 구현예에서, 샘플 및 염료는 약 35°C로 약 5분, 약 10분, 약 15분, 약 20분, 약 25분, 약 30분, 약 35분 또는 약 40분 동안 가열된다. 일부 구현예에서, 샘플 및 표지는 약 35°C로 약 15분 동안 가열된다. 이러한 가열 단계는 변성된, 표지된 관심 단백질을 포함하는 샘플을 생성할 수 있다. 과량의 표지는, 예를 들어 스핀 필터를 사용함으로써 샘플로부터 임의로 제거될 수 있다.
- [0079] 일부 구현예에서, 표지화 반응은 탈당질화 반응 전에 종결(퀵칭)된다. 예를 들어, 형광 표지가 Perkin Elmer Pico 표지 염료인 구현예에서, 표지화 반응은 동일한 부피의 Perkin Elmer Pico 종결 완충제를 표지화 반응에 첨가함으로써 종결될 수 있다. 일부 구현예에서, 표지화 반응은 5 μL, 6 μL, 7 μL, 8 μL, 9 μL, 10 μL, 11 μL, 12 μL, 13 μL, 14 μL, 15 μL, 16 μL, 17 μL, 18 μL, 19 μL, 또는 20 μL의 적절한 종결 용액을 표지화 반응에 첨가함으로써 퀵칭된다. 일부 구현예에서, 염료는 Perkin Elmer Pico 표지 염료이고, 표지화 반응은 5 μL의 Perkin Elmer Pico 종결 용액을 표지화 반응에 첨가함으로써 퀵칭된다. 추가의 예시적인 종결 완충제는, 예를 들어 표지가 아민-반응성 형광 염료를 포함할 때, 1.5 M 하이드록실아민, pH 8.5를 포함한다.

당업자는 다양한 염료화 표지 반응에 대해 적절한 종결 완충액을 선택할 수 있을 것이다. 이론에 구속되고자 함이 없이, 표지화 반응을 권장하는 것은 후속하는 탈당질화 단계에 사용되는 엔도글리코시다아제 효소의 표지화를 방지하는 것으로 여겨진다. 이는 표지된 샘플을 시각화하는 데 사용되는 전기영동도에서 표지된 엔도글리코시다아제 피크를 방지하거나 감소시킨다.

**[0080] 관심 단백질**

**[0081]** 본 개시는 전기영동을 사용한 분석을 위해 관심 단백질이 포함된 샘플을 제조하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 당질화된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 관심 단백질을 표지한 다음, 탈당질화하는 단계를 포함한다.

**[0082]** N-연결된 당질화 또는 O-연결된 당질화와 같은 번역 후 변형을 포함하는 모든 관심 단백질은 본 개시의 범위 내에 포함되는 것으로서 고려된다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 치료 항체와 같은 치료 단백질이고, 치료 단백질은 원료의약품, 제형화된 원료의약품, 또는 완제의약품일 수 있다.

**[0083]** 일부 구현예에서, 관심 단백질은 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 항체, 항체 단편, 또는 단쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 항체, 항체 단편, 또는 scFv이다.

**[0084]** 일부 구현예에서, 관심 단백질은 재조합 인간 단백질을 포함한다. 예를 들어, 관심 단백질은 인간 항체 또는 항체 단편, 또는 인간화 항체 또는 항체 단편을 포함할 수 있다.

**[0085]** 본원에서 사용되는 바와 같이, "항체"는 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 이황화 결합에 의해 상호 연결된 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)로 이루어진 면역글로불린 분자를 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(HCVR 또는 VH)과 중쇄 불변 영역을 갖는다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 함유한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 및 경쇄 불변 영역을 갖는다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인(CL)으로 구성된다. VH와 VL 영역은, 프레임워크 영역(FR)으로 지칭되는 더 보존적인 영역이 중간에 끼어 있는 상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭되는 초가변 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단에서 카르복시 말단의 방향으로 다음 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 용어 "항체"는 임의의 이소형 또는 서브클래스의 당질화된 면역글로불린 및 당질화되지 않은 면역글로불린 모두에 대한 기준을 포함한다. 용어 "항체"는 항체를 발현하도록 형질감염된 숙주 세포로부터 단리된 항체와 같이, 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성, 또는 단리된 항체 분자를 포함한다. 용어 항체는 또한 하나 초과와 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 이종사량체(heterotetrameric) 면역글로불린을 포함하는, 이종특이성 항체를 포함한다. 이종특이적 항체는 미국 특허 제8,586,713호에 일반적으로 기술되어 있으며, 동 문헌은 참조로서 본원에 통합된다.

**[0086]** 항체의 "항원 결합 부분"(또는 "항체 단편")이란 용어는 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 "항원 결합 부분"이라는 용어 내에 포함되는 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인, Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인, F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어진, dAb 단편 (Ward 등. (1989) Nature 241:544-546), (vi) 단리된 CDR, 및 (vii) Fv 단편 VL 및 VH의 2개의 도메인으로 이루어지며, 합성 링커에 의해 연결되어 VL 및 VH 영역이 1가 분자를 형성하도록 쌍을 이루는 단일 단백질 사슬을 형성하게 되는, scFv를 포함한다. 디아바디(diabody)와 같은 다른 형태의 단쇄 항체도 "항체"라는 용어에 포함된다(예를 들어, Holliger 등의 문헌[(1993) PNAS USA 90:6444-6448]; Poljak 등의 문헌[(1994) Structure 2:1121-1123] 참조).

**[0087]** 또한, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 항체 또는 항체 부분이 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩티드와 공유 또는 비공유 결합함으로써 형성된 더 큰 면역 부착 분자의 일부분일 수 있다. 이러한 면역 부착 분자의 예는 사량체 scFv 분자를 제조하기 위한 스트렙타비딘 코어 영역의 사용(Kipriyanov 등의 문헌[(1995) Human Antibodies and Hybridomas 6:93-101]) 및 2가 및 비오틴화된 scFv 분자를 제조하기 위한 시스테인 잔기, 마커 펩티드, 및 C-말단 폴리히스티딘 태그의 사용(Kipriyanov 등의 문헌[(1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058])을 포함한다. Fab 및 F(ab')<sub>2</sub> 단편과 같은 항체 부분은 종래 기술을 사용하여, 예컨대 전체 항체의 파파인 또는 펩신 분해를 통해 전체 항체로부터 제조될 수 있다. 또한, 항체, 항체 부분, 및 면역 부착 분자는 당업계에 흔히 알려져 있는 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 수득할 수 있다(Sambrook 등의 1989 문헌 참조).

**[0088]** 용어 "인간 항체"는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를

포함한다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기(예컨대, 시험관 내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체 내 체세포성 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 예를 들어 CDR에 포함할 수 있고, 특히 CDR3에 포함할 수 있다.

[0089] 본원에서 사용되는 용어 "인간화 항체"는 또 다른 포유류 종, 예를 들면 마우스의 생식선으로부터 유도된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 이식되거나, 달리 변형되어 인간에서 자연적으로 생성되는 항체 변이체에 대한 유사성을 증가시키는 항체를 포함한다.

[0090] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 항체이다. 일부 구현예에서, 항체는 항-예정 세포 사멸(Programmed Cell Death) 1 항체 (예를 들어, 미국 특허출원 공개 제US2015/0203579A1호에 기술된 것과 같은 항-PD1 항체), 항-예정 세포 사멸 리간드-1 (예를 들어, 미국 특허출원 공개 제US2015/0203580A1호에 기술된 것과 같은 항-PD-L1 항체), 항-D114 항체, 항-안지오펜이오틴(Angiopoetin)-2 항체 (예를 들어, 미국 특허 제9,402,898호에 기술된 것과 같은 항-ANG2 항체), 항-안지오펜이오틴-유사 3 항체 (예를 들어, 미국 특허 제9,018,356호에 기술된 것과 같은 항-AngPt13 항체), 항-혈소판 유래 성장 인자 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허 제9,265,827호에 기술된 것과 같은 항-PDGFR 항체), 항-Erb3 항체, 항-프로라틴 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허 제9,302,015호 기술된 것과 같은 항-PRLR 항체), 항-보체 5 항체 (예를 들어, 미국 특허출원 공개 제US2015/0313194A1호에 기술된 것과 같은 항-CS 항체), 항-TNF 항체, 항-표피 성장 인자 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허 제9,132,192호에 기술된 것과 같은 항-EGFR 항체, 또는 미국 특허출원 공개 제US2015/0259423A1호에 기술된 것과 같은 항-EGFRvIII 항체), 항-전구단백질 전환효소 썬틸리신 썬틴(Proprotein Convertase Subtilisin Kexin)-9 항체 (예를 들어, 미국 특허 제8,062,640호 또는 미국 특허 제9,540,449호에 기술된 것과 같은 항-PCSK9 항체), 항-성장 및 분화 인자-8 항체 (예를 들어, 미국 특허 제8,871,209호 또는 제9,260,515호에 기술된 것과 같은, 항-미오스타틴 항체로도 알려진 항-GDF8 항체로서), 항-글루카곤 수용체 (예를 들어, 미국 특허출원 공개 제US2015/0337045A1호 또는 제US2016/0075778A1호에 기술된 것과 같은 항-GCGR 항체), 항-VEGF 항체, 항-IL1R 항체, 인터루킨 4 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허출원 공개 제US2014/0271681A1호 또는 미국 특허 제 8,735,095호 또는 제8,945,559호에 기술된 것과 같은 항-IL4R 항체), 항-인터루킨 6 수용체 항체 (예를 들어, 미국 특허 제7,582,298호, 제8,043,617호 또는 제9,173,880호에 기술된 것과 같은 항-IL6R 항체), 항-IL1 항체, 항-IL2 항체, 항-IL3 항체, 항-IL4 항체, 항-IL5 항체, 항-IL6 항체, 항-IL7 항체, 항-인터루킨 33 (예를 들어, 미국 특허 제9,453,072호 또는 제9,637,535호에 기술된 것과 같은 항-IL33 항체), 항-호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory syncytial virus) 항체 (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제9,447,173호에 기술된 것과 같은 항-RSV 항체), 항-분화 클러스터 3 (예를 들어, 미국 특허 제9,447,173호 및 9,447,173호, 및 미국 특허출원 제62/222,605호에 기술된 것과 같은 항-CD3 항체), 항-분화 클러스터 20 (예를 들어, 미국 특허 제 9,657,102호 및 제US20150266966A1호, 및 미국 특허 제7,879,984호에 기술된 것과 같은 항-CD20 항체), 항-CD19 항체, 항-CD28 항체, 항-분화 클러스터-48 (예를 들어, 미국 특허 제9,228,014호에 기술된 것과 같은 항-CD48 항체), (예를 들어, 미국 특허 제9,079,948호에 기술된 것과 같은) 항-Fcγd1 항체, 항-중동 호흡기 증후군 바이러스(Middle East Respiratory Syndrome virus) (예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제US2015/0337029A1호에 기술된 것과 같은 항-MERS 항체), (예를 들어, 미국 특허출원 공개 제US2016/0215040에 기술된 것과 같은) 항-에볼라 바이러스(Ebola virus) 항체, 항-지카 바이러스(Zika virus) 항체, 항-림프구 활성화 유전자(Lymphocyte Activation Gene) 3 항체 (예, 항-LAG3 항체, 또는 항-CD223 항체), 항-신경 성장 인자(Nerve Growth Factor) 항체 (예를 들어, 미국 특허출원 공개 제US2016/0017029호 및 미국 특허 제8,309,088호 및 제 9,353,176호에 기술된 것과 같은 항-NGF 항체) 및 항-단백질 Y 항체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 (미국 특허출원 공개 제US2014/0088295A1호 및 제US20150266966A1호에 기술된 것과 같은) 항-CD3 x 항-CD20 이중특이적 항체, 항-CD3 x 항-뮤신(Mucin) 16 이중특이적 항체 (예: 항-CD3 x 항-Muc16 이중특이적 항체), 및 항-CD3 x 항-전립선-특이적 막 항원 이중특이적 항체 (예: 항-CD3 x 항-PSMA 이중특이적 항체)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0091] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 암억제제(abciximab), 아달리무맙(adalimumab), 아달리무맙-아토(adalimumab-atto), 아도-트라스투주맙(ado-trastuzumab), 알렘투주맙(alemtuzumab), 알리로쿠맙(alirocumab), 아테졸리주맙(atezolizumab), 아벨루맙(avelumab), 바실릭시맙(basiliximab), 벨리무맙(belimumab), 벤랄리주맙(benralizumab), 베바시주맙(bevacizumab), 베즐로톡주맙(bezlotoxumab), 블리나투모맙(blinatumomab), 브렌투시맙 베도틴(brentuximab vedotin), 브로달루맙(brodalumab), 카나키누맙(canakinumab), 캅프로맙 펜데티드(capromab pendetide), 세톨리주맙 페골(certolizumab pegol), 세미플리맙(cemiplimab), 세투시맙(cetuximab), 데노수맙(denosumab), 디누투시맙(dinutuximab), 두필루맙(dupilumab), 더발루맙(durvalumab), 에쿨리주맙(eculizumab), 엘로투주맙(elotuzumab), 에미시주맙-kxwh(emicizumab-kxwh), 엠탄신알리로쿠맙

(emtansinealirocumab), 에비나쿠맙(evinacumab), 에볼로쿠맙(evolocumab), 파시누맙(fasimumab), 골리무맙(golimumab), 구셀쿠맙(guselkumab), 이브리투모맙 타이옥세탄(ibritumomab tiuxetan), 이다루시주맙(idarucizumab), 인플릭시맙(infliximab), 인플릭시맙-abda(infliximab-abda), 인플릭시맙-dyyb(infliximab-dyyb), 이필리무맙(ipilimumab), 익세키주맙(ixekizumab), 메폴리주맙(mepolizumab), 네시투무맙(necitumumab), 네스바쿠맙(nesvacumab), 니볼루맙(nivolumab), 오빌톡삭시맙(obiltoxaximab), 오비누투주맙(obinutuzumab), 오크렐리주맙(ocrelizumab), 오파투무맙(ofatumumab), 올라라투맙(olaratumab), 오말리주맙(omalizumab), 파니투무맙(panitumumab), 펌브롤리주맙(pembrolizumab), 퍼투주맙(pertuzumab), 라무시루맙(ramucirumab), 라니비주맙(ranibizumab), 락시바쿠맙(raxibacumab), 레스리주맙(reslizumab), 리누쿠맙(rinucumab), 리톡시맙(rituximab), 사리루맙(sarilumab), 세쿠키누맙(secukinumab), 실톡시맙(siltuximab), 토실리주맙(tocilizumab), 토실리주맙(tocilizumab), 트라스투주맙(trastuzumab), 트레보그루맙(trevogrumab), 우스테키누맙(ustekinumab), 및 베돌리주맙(vedolizumab)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0092] 관심 단백질은 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 생성되거나 단리될 수 있다. 이들은 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 단백질(예: 항체)과 같은 재조합 수단을 포함한다. 관심 단백질인 항체는 재조합, 조합적 인간 항체 라이브러리로부터 단리되거나, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자이식된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 단리되거나(예를 들어, Taylor 등의 문헌[(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295]), 인간 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성, 또는 단리될 수 있다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 소정의 구현예에서, 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이 유발(또는 인간 Ig 서열에 대해 유전자 도입된 동물이 사용되는 경우에서의, 생체 내 체세포 돌연변이 유발)을 거치므로, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은 인간 생식선 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이들과 관련되지만, 생체 내에서 인간 항체 생식선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있다.

[0093] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 결정화 가능한 단편(Fc) 도메인을 포함한다. 예를 들어, 관심 단백질은 수용체-Fc-융합 단백질 또는 가용성 TCR-Fc 융합 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, 수용체-Fc-융합 단백질은 트랩 단백질이다.

[0094] 융합 단백질은 달리 자연에서 함께 발견되지 않는 단백질의 둘 이상의 부분을 포함한다. 예를 들어, “Fc 융합 단백질”은 수용체 리간드 결합 도메인과 같은 다른 이종 도메인에 융합되는, 면역글로불린 분자의 Fc 부분을 포함할 수 있다. (Fc 도메인을 포함하는) 항체-유래 폴리펩티드의 다양한 부분에 융합된 이종 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질의 제조는, 예를 들어 Ashkenazi 등의 문헌[Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 10535, 1991]; Byrn 등의 문헌[Nature 344:677, 1990]; 및 Hollenbaugh 등의 문헌["Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1 - 10.19.11, 1992]에 기술되어 있다. “수용체 Fc 융합 단백질”은 Fc 모이어티에 결합된 수용체의 하나 이상의 세포외 도메인(들)을 포함하며, 일부 구현예에서는, 힌지 영역 및 이어지는 면역글로불린의 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc-융합 단백질은 하나 이상의 리간드(들)에 결합하는 둘 이상의 구별되는 수용체 사슬을 포함한다. 예를 들어, Fc-융합 단백질은 예를 들어, 인터류킨 1(IL-1) 트랩(예를 들어, hlgG1의 Fc에 융합된 IL-1 R1 세포외 영역에 융합된 IL-1 RAcP 리간드 결합 영역을 함유하는 릴로나셉트(rilonacept); 미국 특허 제6,927,004호 참조), 또는 혈관 내피 성장 인자 A(VEGF) 트랩(예를 들어, hlgG1의 Fc 영역에 융합된 VEGF 수용체 Flk1의 Ig 도메인 3에 융합된 VEGF 수용체 Flt1의 Ig 도메인 2를 포함하는 애플리버셉트(aflibercept); 미국 특허 제7,087,411호 및 제 7,279,159호 참조)과 같은 트랩이다.

[0095] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 수용체 융합 단백질과 같은 융합 단백질이다. 수용체 융합 단백질은, 특히, 트랩 단백질 및 미니 트랩 단백질을 포함할 수 있다.

[0096] 용어 “융합 단백질”은 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자의 유전적 발현을 통해 임의로 생성된, 이들의 개별 펩티드 백본을 통해 공유 결합에 의해 연결된 2개 이상의 단백질 또는 이의 단편을 포함하는 분자를 지칭한다.

[0097] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 트랩 단백질 또는 미니 트랩 단백질이다. 일부 구현예에서, 트랩 단백질은 표적 단백질에 결합하여 표적 단백질의 활성을 길항시키거나 조절하는 유인 수용체로서 작용할 수 있는 조작된 치료 단백질이다. 예시적인 트랩 단백질은, 인간 IgG 불변 영역에 융합되고 링커, 이량체화 또는 다량체화 도메인, 절단 부위와 같은 추가 도메인을 임의로 포함하는 수용체의 표적 단백질에 대한 결합 도메인(예: Flt-1의 VEGF 수용체 Ig 도메인 2 및 Ig 도메인 3)을 모방하는 하나 이상의 수용체 성분을 포함한다. 일부 구현예에

서, 트랩 단백질은, 예를 들어 단백질 절단을 통해 절단되거나 크기가 감소된 트랩 단백질(미니 트랩)이며, 단백질 절단은 미니 트랩의 조직 침투에 도움을 줄 수 있다. 트랩 단백질의 비제한적인 예는 IL-1 트랩(예를 들어, IL-1R1 세포의 영역에 융합되고 궁극적으로 hlgG1의 Fc에 융합되는 IL-1RAcP 리간드 결합 영역을 포함하는 릴로나셉트)(예: 서열번호 1)(미국 특허 제6,927,004호 참조), 또는 VEGF 트랩(예를 들어, VEGF 수용체 Flk1의 Ig 도메인 3에 융합되고, 궁극적으로 hlgG1의 Fc에 융합되는 VEGF 수용체 Flt1의 Ig 도메인 2를 포함하는 애플리버셉트)을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제7,087,411호, 제7,279,159호를 참조하고; 에타너셉트(etanercept)(TNF 트랩)에 대해서는 미국 특허 제5,610,279호를 또한 참조하며, 이들 각각의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0098] 단백질 생산

[0099] 본원에 기술된 방법에 의해 검정된 관심 단백질은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 관심 단백질은 세포 배양에 의해 생산될 수 있다. 세포 배양은, 회분식 배양을 지칭하는 "유가식(fed-batch) 세포 배양" 또는 "유가식 배양"일 수 있으며, 여기서 세포 및 배양 배지는 초기에 배양 용기에 공급되고, 배양 종결 전에 주기적인 세포 및/또는 생성물 수확이 있거나 없이, 배양 동안 배양에 개별적으로 증분씩, 추가 배양 영양분이 천천히 공급된다. 유가식 배양은 주기적으로 전체 배양물(세포 및 배지를 포함할 수 있음)이 제거되고 신선한 배지로 교체되는 "반-연속 유가식 배양"을 포함한다. 유가식 배양은 단순한 "회분식 배양"과 구별되는 반면, 세포 배양을 위한 모든 성분(동물 세포 및 모든 배양 영양분 포함)은 회분식 배양의 배양 과정이 시작될 때 배양 용기에 공급된다. 유가식 배양은, 표준 유가식 공정 동안 상층액이 배양 용기로부터 제거되지 않는 한, "관류 배양(perfusion culture)"과 상이할 수도 있는 반면, 관류 배양에서는, 세포가 예를 들어 여과에 의해 배양물에 억류되고, 배양 배지는 배양 용기에 연속적으로 또는 간헐적으로 도입되고 제거된다. 그러나, 유가식 세포 배양 동안 시험 목적으로 샘플을 제거하는 것이 고려된다. 유가식 공정은 최대 작업량 및/또는 단백질 생산에 도달되었다고 판정될 때까지 계속되고, 이어서 단백질이 수확된다.

[0100] 세포 배양은 "연속 세포 배양"일 수 있는데, 이는 일반적으로 특정 성장 단계에서, 세포를 연속적으로 성장시키는 데 사용되는 기술이다. 예를 들어, 지속적인 세포 공급이 필요하거나, 특정 관심 단백질의 생산이 필요한 경우, 세포 배양을 특정 성장 단계에 유지하는 것이 필요할 수 있다. 따라서, 특정 단계에 세포를 유지하기 위해서는 이에 따라 조건들을 지속적으로 모니터링하고 조정해야 한다.

[0101] 세포는 세포 배양 배지에서 배양된다. "세포 배양 배지" 및 "배양 배지"라는 용어는 탄수화물 에너지원, 필수(예, 페닐알라닌, 발린, 트레오닌, 트립토판, 메티오닌, 류신, 이소류신, 리신 및 히스티딘) 및 불필수(예, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글리신, 프롤린, 세린 및 티로신) 아미노산, 미량 원소, 에너지원, 지질, 비타민 등 같은, 세포의 성장을 향상시키는 데 필요한 영양소를 통상적으로 제공하는 포유류 세포 성장에 사용되는 영양분 용액을 지칭한다. 세포 배양 배지는 추출물, 예를 들어 세포 성장을 지원하기 위한 원료를 공급하는, 혈청 또는 펩톤(가수분해물)을 함유할 수 있다. 배지는 동물-유래 추출물 대신, 효모-유래 또는 대두 추출물을 함유할 수도 있다. 화학적 한정 배지는 모든 화학 성분이 알려져 있는(즉, 공지된 화학 구조를 갖는) 세포 배양 배지를 지칭한다. 화학적 한정 배지에는 혈청- 또는 동물-유래 펩톤과 같은, 동물-유래 성분이 전혀 없다. 일 구현예에서, 배지는 화학적으로 정의된 배지이다.

[0102] "세포주"는 세포의 연속 계대 배양 또는 서브-배양을 통해 특정 계통으로부터 유래된 세포 또는 세포들을 지칭한다. 용어 "세포"는 "세포 집단"과 상호 교환적으로 사용된다. 용어 "세포"는 재조합 핵산 서열을 발현시키는 데 적합한 임의의 세포를 포함한다. 세포는 박테리아 세포, 포유 동물 세포, 인간 세포, 비-인간 동물 세포, 조류 세포, 곤충 세포, 효모 세포 같은, 원핵 세포 및 진핵 세포, 또는 예를 들어 하이브리도마 또는 쿼드로마와 같은 세포 융합물을 포함한다. 소정의 구현예에서, 세포는 인간, 원숭이, 유인원, 햄스터, 랫트, 또는 마우스 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 다음 세포로부터 선택된다: 중국 햄스터 난소(CHO) (예, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (예, COS-7), 망막 세포, Vero, CV1, 신장 (예, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, 림프구, 예를 들어, Jurkat (T 림프구) 또는 Daudi (B 림프구), A431 (표피), U937, 3T3, L 세포, C127 세포, SP2/0, NS-0, MMT 세포, 줄기 세포, 종양 세포, 및 상기 언급한 세포 유래의 세포주. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 바이러스 유전자, 예를 들어, 바이러스 유전자를 발현하는 망막 세포(예를 들어, PER.C6® 세포)를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 CHO 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 CHO K1 세포이다.

[0103] 세포는, 형질전환, 형질감염, 전기천공 등을 포함하되 이들로 한정되지는 않는, 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 관심 단백질을 암호화하는 이중 폴리뉴클레오티드로 형질전환될 수 있다.

[0104] 용어 “이중 폴리뉴클레오티드”는 야생형 세포에서 발견되지 않는 이중 뉴클레오티드 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭하며, 관심 단백질을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 예시적인 이중 폴리뉴클레오티드는 관심 단백질을 암호화하는 서열을 포함하는 벡터를 포함하며, 상기 벡터는 플라스미드, 파지, 및 바이러스 입자를 포함하지만 이들로 한정되지는 않는다. 임의로, 벡터는 특정 핵산 분자를 세포에 전달할 수 있게 한다. 적절한 세포 내로 도입될 때, 발현 벡터는 관심 단백질의 발현을 유도하기 위해 필수 유전 요소를 함유한다. 예시적인 벡터는, 관심 단백질을 암호화하는 서열에 작동 가능하게 연결된 전사 프로모터 요소(즉, 발현 조절 서열)를 포함할 수 있다. 벡터는 DNA, 또는 RNA, 또는 이 둘의 조합(예를 들어, DNA-RNA 키메라)으로 구성될 수 있다. 임의로, 벡터는 폴리아데닐화 서열, 하나 이상의 제한 부위를 비롯하여 포스포트랜스퍼라아제 또는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제와 같은 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 추가로, 선택된 세포 유형 및 사용된 벡터에 따라, 복제 기점, 추가 핵산 제한 부위, 인핸서, 및 전사 유도성을 부여하는 서열과 같은 다른 유전적 요소가 벡터에 통합될 수도 있다. 적절한 벡터 및 형질전환 방법의 선택은 당업자에게 명백할 것이다.

[0105] 당질화

[0106] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 당질화된다. 당질화는 N-연결된 당질화, O-연결된 당질화, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 세포 배양에서 생산된 많은 관심 단백질 및 폴리펩티드는 올리고당 사슬(글리칸)을 포함하여 공유 연결된 탄수화물 구조를 함유하는 당단백질이다. 이들 올리고당 사슬은 N-연결 또는 O-연결을 통해 소포체 및 골지 장치의 단백질에 연결된다. 올리고당 사슬은 당단백질 질량의 상당 부분을 포함할 수 있다. 올리고당 사슬은 당단백질의 올바른 접힘을 용이하게 하고, 단백질-단백질 상호작용을 매개하고, 안정성을 부여하고, 유리한 약리학 및/또는 약동학적 특성을 부여하고, 단백질 분해를 억제하고, 당단백질을 적절한 분비 경로에 대해 표적화하고, 당단백질을 특정 기관(들)에 대해 표적화하는 것을 포함하는 역할을 할 수 있다.

[0107] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 N-연결된 당질화를 포함한다. 일반적으로, N-연결된 올리고당 사슬은 소포체 내강에 있는 초기 전위 단백질에 첨가된다. 올리고당은 표적 컨센서스 서열 내에 포함된 아스파라긴 잔기, 예컨대 Asn-X-Ser/Thr 또는 일부 경우에 Asn-X-Cys(여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산일 수 있음)의 측쇄상의 아미노기에 첨가된다. 초기 올리고당 사슬은 일반적으로 소포체 내의 특정 글리코시다아제 효소에 의해 트리밍되어, 2개의 N-아세틸글루코사민 및 3개의 만노오스 잔기로 이루어진 짧은 분지형 코어 올리고당을 생성한다.

[0108] 소포체에서 초기 가공 후, 당단백질은 추가 가공을 거친 후에 세포 표면으로 분비될 수 있다. N-연결된 올리고당 사슬은 만노오스 잔기의 첨가에 의해 변형되어 고-만노오스 올리고당을 생성할 수 있다. 대안적으로, N-아세틸글루코사민의 하나 이상의 단당류 단위가 코어 만노오스 서브유닛에 첨가되어 복합 올리고당을 형성할 수 있다. 갈락토오스가 N-아세틸글루코사민 서브유닛에 첨가되고, 시알산 서브유닛이 갈락토오스 서브유닛에 첨가되어 시알산, 갈락토오스, 또는 N-아세틸글루코사민 잔기로 종결되는 사슬을 생성할 수 있다. 또한, 푸코오스 잔기가 코어 올리고당의 N-아세틸글루코사민 잔기에 첨가될 수 있다. 이러한 첨가 각각은 특정 글리코실 전이효소에 의해 촉매된다.

[0109] N-연결된 당질화 경로에 의해 변형되는 것에 추가하여, 당단백질은 이들이 Golgi 장치에서 가공될 때 특정 세린 또는 트레오닌 잔기에 O-연결된 올리고당 사슬을 첨가함으로써 변형될 수도 있다. O-연결된 올리고당의 잔기는 한 번에 하나씩 첨가되고, 각 잔기의 첨가는 특정 효소에 의해 촉매된다. N-연결된 당질화와 대조적으로, O-연결된 당질화에 대한 컨센서트 아미노산 서열은 정의가 덜되어 있다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 O-연결된 당질화를 포함한다. 일부 구현예에서, O-연결된 당질화는 관심 단백질의 세린(Ser) 또는 트레오닌(Thr) 아미노산에 대한 당 분자의 부착을 포함한다.

[0110] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 당질화된 단백질이다. 일부 구현예에서, 당질화된 단백질은 적어도 하나의 부착된 글리칸을 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 적어도 1개의 부착된 글리칸, 적어도 2개의 부착된 글리칸, 적어도 3개의 부착된 글리칸, 적어도 4개의 부착된 글리칸, 적어도 5개의 부착된 글리칸, 적어도 6개의 부착된 글리칸, 적어도 7개의 부착된 글리칸, 적어도 8개의 부착된 글리칸, 적어도 9개의 부착된 글리칸, 적어도 10개의 부착된 글리칸, 적어도 11개의 부착된 글리칸, 적어도 12개의 부착된 글리칸, 적어도 15개의 부착된 글리칸, 적어도 20개의 부착된 글리칸, 또는 적어도 25개의 부착된 글리칸을 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개의 부착된 글리칸을 갖는다. 일부 구현예에서, 글리칸은 N-연결된다. 일부 구현예에서, 글리칸은 O-연결된다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 N-연결된 글리칸 및 O-연결된 글리칸 둘 다를 포함한다.

- [0111] 일부 구현예에서, 관심 단백질은 당질화된 단백질이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 적어도 하나의 당질화 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 적어도 하나의 당질화 부위, 적어도 2개의 당질화 부위, 적어도 3개의 당질화 부위, 적어도 4개의 당질화 부위, 적어도 5개의 당질화 부위, 적어도 6개의 당질화 부위, 적어도 7개의 당질화 부위, 적어도 8개의 당질화 부위, 적어도 9개의 당질화 부위, 적어도 10개의 당질화 부위, 적어도 10개의 당질화 부위, 적어도 11개의 당질화 부위, 적어도 12개의 당질화 부위, 적어도 15개의 당질화 부위, 적어도 20개의 당질화 부위, 또는 적어도 25개의 당질화 부위를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 당질화 부위는 N-연결된 당질화 부위, 예를 들어 N-연결된 당질화 컨센서트 서열 내의 아스파라긴이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 당질화 부위는 O-연결된 당질화 부위, 예를 들어 세린 또는 트레오닌이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질은 적어도 하나의 N-연결된 당질화 부위 및 적어도 하나의 O-연결된 당질화 부위 둘 다를 포함한다.
- [0112] 일부 구현예에서, 글리칸은 당질화된 단백질의 총 중량(5% 중량/중량 또는 w/w)의 적어도 0.5%, 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 또는 적어도 75%를 포함한다. 일부 구현예에서, 글리칸은 당질화된 단백질의 총 중량의 적어도 5%(5% w/w)를 포함한다. 일부 구현예에서, 글리칸은 당질화된 단백질의 총 중량의 적어도 10%(10% w/w)를 포함한다. 글리칸으로 이루어진 단백질 중량의 백분율을 결정하는 방법은 당업자에게 쉽게 명백해질 것이고, 아미노산 서열로부터 유래된 예상 중량을 본원에 기술된 전기영동 분석 방법에 의해 결정된 실제 중량과 비교하는 단계를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0113] **기준 표준**
- [0114] 일부 구현예에서, 기준 표준은 관심 단백질을 포함하는 샘플과 병행하여 동일한 제조 방법을 거치고, 관심 단백질을 포함하는 샘플과 병행하여 분석된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 관심 단백질의 하나 이상의 특성을 기준 표준과 비교하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 상기 방법은 관심 단백질의 전기영동도와 기준 표준을 비교하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0115] 본원에서 사용되는 바와 같이, “기준 표준(reference standard)”은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 이전에 분석되었고 그 특성이 알려진 단백질을 포함하는 샘플을 지칭한다. 알려진 특성은 기준 표준의 아미노산 서열(예: 예측 분자량)로부터 결정되거나, 실험적으로 결정될 수 있다(예: 전기영동도 프로파일). 이들 특성은 예상 분자량 및 실험적으로 결정된 분자량, 본원에 기술된 방법 또는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 생성된 전기영동도(들), 등전점, 소광 계수(관심 단백질이 주어진 과정에서 광을 얼마나 강하게 흡수하는지에 대한 척도), 당질화 부위의 수, 및 부착된 글리칸의 분자량을 포함할 수 있지만 이들로 한정되지는 않는다. 기준 표준은 하나 이상의 특성에 있어서 관심 단백질과 유사할 수 있다. 예를 들어, 관심 단백질 및 기준 표준 둘 다는 단클론 항체이거나, Fc 도메인을 포함하거나, 유사한 분자량 등을 가질 수 있다.
- [0116] 일부 구현예에서, 기준 표준은 관심 단백질을 포함한다. 예를 들어, 기준 표준은 샘플에서 유래되기 보다는 이전에 특성화되었고 분해를 방지하도록 조절된 조건에서 보관된 관심 단백질의 별도 배치에서 유래될 수 있다.
- [0117] 일부 구현예에서, 본 개시는 전기영동을 사용해 분석하기 위한 관심 단백질 및 기준 표준을 포함하는 샘플을 제조하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 (a) 샘플 및 기준 표준을 변성시키는 단계; (b) 관심 단백질 및 기준 표준을 형광 표지로 표지하여 표지된 샘플 및 표지된 기준 표준을 생성하는 단계; (c) 관심 단백질 및 기준 표준의 표지화 반응을 쿼칭하는 단계, (d) 표지된 샘플 및 표지된 기준 표준을 엔도글리코시다아제로 탈당질화하는 단계; 및 (e) 표지된 샘플 및 표지된 기준 표준에 대한 전기영동을 수행하는 단계를 포함하되; 샘플 및 기준 표준은 단계 (d)의 탈당질화 전에 단계 (b) 및 (c)에서 표지되고 쿼칭된다.
- [0118] 일부 구현예에서, 전기영동은 마이크로칩 모세관 전기영동(MCE)이고, 출력은 전기영동도이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 관심 단백질 및 기준 표준에 대한 주 피크 강도를 결정하는 단계, 및 관심 단백질에 대한 주 피크의 강도 값과 기준 표준에 대한 주 피크의 강도 값을 비교하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 단백질 또는 기준 표준의 주 피크는 당질화된다. 일부 구현예에서, 관심 단백질 또는 기준 표준의 주 피크는 당질화되지 않고, 본원에 기술된 방법을 사용하여 표지된 후 탈당질화되었다. 일부 구현예에서, 주 피크를 결정하는 단계는 주 피크의 높이를 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 주 피크를 결정하는 단계는 주 피크의 면적을 결정하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 주 피크를 결정하는 단계는 피크의 시간 보정된 면적을 결정하는 단계를 포함하는데, 시간 보정된 면적은 즉 피크 면적을 이의 이동 시간으로 나눈 것이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질의 주 피크 강도는 기준 표준의 주 피크 강도의 50% 내지 150%, 50% 내지 140%, 50% 내지 130%, 50% 내지 120%, 50% 내지 110%, 50% 내지 100%, 50% 내지 90%, 60% 내지 150%, 70% 내지 150%, 80% 내지 150%,

90% 내지 150%, 100% 내지 150%, 110% 내지 150%, 120% 내지 150%, 130% 내지 150%, 140% 내지 150%, 60% 내지 140%, 70% 내지 140%, 70% 내지 130%, 70% 내지 120%, 70% 내지 110%, 80% 내지 140%, 80% 내지 130%, 80% 내지 120%, 80% 내지 110%, 80% 내지 100%, 90% 내지 140%, 90% 내지 130%, 90% 내지 120%, 90% 내지 110%, 또는 90% 내지 100% 이내이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질의 주 피크 강도는 기준 표준의 주 피크 강도의 60% 내지 140%, 70% 내지 130%, 80% 내지 120%, 또는 90% 내지 110% 이내이다. 일부 구현예에서, 관심 단백질의 주 피크 강도는 기준 표준의 주 피크 강도의 70% 내지 130% 이내이다. 기준 표준에 대비 관심 단백질의 주 피크 강도를 결정하면 CE 또는 MCE 기기에 의한 적절한 분리 및 데이터 품질을 보장할 수 있다.

**[0119] 전기영동**

[0120] 본원에 기술된 방법을 사용하여 제조된 관심 단백질이 포함된 샘플을 전기영동을 사용하여 분석하는 방법이 본원에 제공된다.

[0121] 단백질을 분석하기 위한 전기영동 기반 방법은 도데실 (라우릴) 황산나트륨(SDS) 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE), 도데실 황산리튬이 존재하는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 자유 흐름 전기영동, 등전점 전기영동, 모세관 겔 전기영동, 모세관 전기영동(CE), 및 마이크로칩 모세관 전기영동(MCE)과 같은 겔 기반 방법을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0122] 일부 구현예에서, 전기영동은 CE이다. 일부 구현예에서, CE는 도데실 황산나트륨(LDS) 완충제를 포함한다.

[0123] 일부 구현예에서, 전기영동은 MCE이다. 용어 “MCE” 또는 “마이크로칩 모세관 전기영동” 및 “모세관 전기영동(CE)” 은 샘플에서 분석물을 분리하는 데 사용되는 모세관 전기영동(CE) 및 이의 미세 유체 대응체(MCE)를 지칭한다. MCE 기술은 단백질 샘플에서 관심 단백질, 불순물을 분리, 식별, 및 정량화하고, 단백질 단편과 같은 관심 단백질의 분해 산물을 분석하는데 사용될 수 있다. CE 및 MCE는 전압이 샘플에 인가될 때의 전기영동 이동성에 기초하여 분석물을 분리한다. 겔 매트릭스(예: 겔 전기영동)의 존재는 크기뿐만 아니라 전하에 기초하여 분석물을 분리시킬 것이다. 샘플 내의 불순물은 단백질 응집체, 단백질 단편, 단백질 다량체, 및 검정 오염물을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0124] MCE에서, 변성된 표지된 관심 단백질을 희석하고, MCE를 수행하여 마이크로칩 모세관 전기영동 시스템 상에서 희석된 단백질 샘플을 분리하여 전기영동도를 생성한다. 다수의 샘플을 동일한 마이크로칩 상에서 병렬로 흘릴 수 있기 때문에, MCE 기반 방법은 고 처리량 접근법에 쉽게 적용할 수 있다. 또한, MCE는 신속하며, 최소 샘플 부피를 사용한다.

[0125] 본원에서 사용되는 바와 같이, 전기영동도는 CE 또는 MCE와 같은 전기영동 방법의 결과인 플롯이다. 전기영동도는 관심 단백질 및 불순물에 상응하는 피크를 함유한다.

[0126] 전기영동도를 분석하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 개별 피크 아래의 위치, 크기, 및 면적을 비교하는 단계를 포함한다. 전기영동도에 대한 피크 면적(피크 아래 면적)을 계산하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 피크 아래 면적을 추정하기 위해 통합하는 단계를 포함한다. 피크 면적은 Empower와 같은 소프트웨어를 사용하여 계산할 수 있다.

[0127] 개시된 MCE 검정을 수행하기 위한 기구가 상업적으로 이용 가능하다. 일부 구현예에서, 개시된 MCE 검정은 LabChip GXII, LabChip GXII Touch™, LabChip GXII Touch™ HT, 및 Protein Express Assay LabChip(LabChip® HT Protein Express Chip)을 사용하여 수행된다.

[0128] 개시된 CE 검정을 수행하기 위한 기구도 상업적으로 이용 가능하다. 예를 들어, CE 검정은 PA 800 Plus Pharmaceutical Analysis System과 같은 Beckman Coulter 모세관 전기영동 시스템을 사용하여 수행될 수 있다.

[0129] 본원에 기술된 방법의 일부 구현예에서, 상기 방법은 표지하는 단계, 및 단백질 표준 분자량 사다리를 실행하여 관심 단백질의 크기를 평가하는 단계를 추가로 포함한다. 단백질 분자량 사다리는 당업자에게 공지되어 있을 것이며, ThermoFisher로부터 입수 가능한 PageRuler, Mark12, BenchMark, PageRuler High Range 및 PageRuler Low Range뿐만 아니라, PerkinElmer의 Protein Pico Assay Reagent Kit에서의 HT PICO Protein Express 사다리를 포함한다. 관심 단백질의 크기에 기초하여 적절한 사다리의 선택하는 것은 당업자에게 명백할 것이다.

**[0130] 응용예**

[0131] 본 개시는 본원에 기술된 표지화 방법, 탈당질화 방법, 및 전기영동 방법을 사용하여 관심 단백질을 특성화하는 방법을 제공한다.

- [0132] 관심 단백질을 분석하는 것은 CE 또는 MCE에 의해 생성된 전기영동도에서 하나 이상의 피크의 수, 위치, 높이, 폭, 강도, 크기, 또는 면적을 특성화하는 것을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0133] 전기영동도에서 피크의 수와 위치를 특성화하면, 관심 단백질의 분해 산물이 샘플에 존재하는지 여부를, 예를 들어 주 피크의 분자량보다 작은 분자량을 갖는 피크로서 결정할 수 있다. 탈당질화되지 않은 관심 단백질, 및 본원에 기술된 방법을 사용하여 탈당질화되고 표지된 관심 단백질로부터 생성된 피크를 비교하면 관심 단백질의 당질화된 형태가 샘플에 존재하는지 여부를 결정할 수 있는데, 이는 관심 단백질의 탈당질화된 주 피크가 관심 단백질의 당질화된 주 피크보다 더 낮은 분자량을 가질 것이기 때문이다.
- [0134] 본 개시의 방법은 다양한 조건 하에서 관심 단백질의 안정성을 분석하는 데 사용될 수 있다. 여기에는 원료의약품 또는 완제의약품으로 제형화된 관심 단백질의 보관 조건이 포함된다. 예를 들어 관심 단백질을 포함하는 기준 샘플과 이의 응력이 가해진 샘플 간의 피크 수 및 피크 면적 비교는, 높거나 낮은 pH, 또는 광에 대한 노출과 같은 다양한 조건 하에서, 시간의 경과에 따른 관심 단백질의 안정성을 결정하는 데 사용될 수 있다.
- [0135] 따라서, 본 개시는 본원에 기술된 관심 단백질을 표지하는 방법 및 탈당질화하는 방법을 사용하여 관심 단백질의 안정성을 결정하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 (a) 관심 단백질이 포함된 샘플에 응력을 가하는 단계; (b) 관심 단백질이 포함된, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플을 변성시키는 단계; (c) 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플에서 관심 단백질을 형광 표지로 표지하여 표지된 응력이 가해진 샘플 및 표지된 응력이 가해지지 않은 샘플을 생산하는 단계; (d) 표지된 응력이 가해진 샘플 및 표지된 응력이 가해지지 않은 샘플에서 미반응 형광 표지를 퀀칭하는 단계; (e) 표지된 응력이 가해진 샘플 및 표지된 응력이 가해지지 않은 샘플을 엔도글리코시다아제로 탈당질화하는 단계; (f) 표지된 응력이 가해진 샘플 및 표지된 응력이 가해지지 않은 샘플에 대해 마이크로칩 모세관 전기영동(MCE)을 수행하여 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플에 대한 전기영동도를 생성하는 단계; 및 (g) 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플의 전기영동도를 비교하는 단계를 포함하되, 응력이 가해진 샘플 및 응력이 가해지지 않은 샘플은 단계 (e)에서 탈당질화 전에 단계 (c) 및 (d)에서 표지되고 퀀칭된다.
- [0136] 샘플 내 관심 단백질에 응력을 가하는 임의의 방법은 본 개시의 방법에 포함되는 것으로서 고려되며, 응력은 화학물질, pH, 방사선, 광, 동결-해동 사이클, 동결 건조, 및 가열을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0137] 일부 구현예에서, 관심 단백질이 포함된 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플에 열적 응력을 가하는 단계를 포함한다. 샘플에 열적 응력을 가하는 단계는, 원료의약품으로서 제형화되었거나 완제의약품으로서 제형화된 관심 단백질에 대한 저장 조건을 시뮬레이션하는 단계, 즉 응력이 가해진 샘플을 약 -80°C 내지 -30°C 또는 약 2°C 내지 약 8°C에서 각각 유지하는 단계를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 샘플에 열적 응력을 가하는 단계는 샘플에 대한 취급 조건 및 운송 조건을 시뮬레이션하는 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 샘플에 열적 응력을 가하는 단계는, 예를 들어 샘플이 노출되는 온도를 증가시킴으로써 샘플의 강제 분해를 유도하는 단계를 포함한다.
- [0138] 일부 구현예에서, 관심 단백질이 포함된 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플에 열적 응력을 가하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 열적 응력은 샘플을 25°C 내지 45°C에서 유지하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 열적 응력은 샘플을 2°C, 4°C, 6°C, 8°C, 10°C, 12°C, 14°C, 16°C, 18°C, 20°C, 22°C, 24°C, 26°C, 28°C, 30°C, 32°C, 35°C, 37°C, 또는 40°C에서 유지하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 열적 응력은 샘플을 37°C에서 유지하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 열적 응력은 샘플을 22°C 내지 26°C에서 유지하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 열적 응력은 샘플을 30°C에서 유지하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 열적 응력은 단백질에 약 25°C 내지 45°C에서 유지하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 열적 응력은 응력이 가해진 샘플을 적어도 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 또는 1년 동안 유지하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플은 2주 동안 유지된다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 샘플은 4주 동안 유지된다.
- [0139] 일부 구현예에서, 샘플에 열적 응력을 가하는 단계는 샘플을 약 25°C 내지 약 45°C에서 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 5주, 적어도 6주, 적어도 7주, 또는 적어도 8주 동안 유지하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 샘플에 열적 응력을 가하는 단계는 샘플을 약 30°C 내지 약 45°C에서 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 적어도 5주, 적어도 6주, 적어도 7주, 또는 적어도 8주 동안 유지시키는 단계를 포함한다.
- [0140] 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 적어도 하나의 동결/해동 사이클을 포함한다. 예를 들어, 액체

샘플로부터 시작하여, 샘플이 냉동될 때까지 온도를 낮춘 다음, 분석 전에 샘플이 액체였던 온도로 샘플을 복귀시킨다.

- [0141] 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플을 보관 조건에 노출시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 보관 조건은 약  $-80^{\circ}\text{C}$  내지  $-30^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 8개월, 적어도 12개월, 적어도 18개월, 적어도 24개월, 또는 적어도 30개월 동안 보관하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 보관 조건은 약  $2^{\circ}\text{C}$  내지  $8^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 8개월, 적어도 12개월, 적어도 18개월 동안 보관하는 것을 포함한다.
- [0142] 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는, 예를 들어 Vortex 교반기 또는 자기 교반기를 사용하여 샘플을 기계적으로 교반하는 단계를 포함한다.
- [0143] 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플을 동결건조하고 재수화하는 단계를 포함한다. 관심 단백질이 포함된 샘플을 동결 건조하는 방법은 당업자에게 공지되어 있을 것이고, 예를 들어 동결 건조 및 분무 건조를 포함한다.
- [0144] 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플을 광, 방사선, 일중량 산소 증, 유리 라디칼, 높은 pH 조건, 또는 낮은 pH 조건에 노출시키는 단계를 포함한다. 예시적인 낮은 pH 조건은 특히, 샘플을 7.0 미만의 pH, 예를 들어 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.0, 1.5, 또는 1.0 미만의 pH에 노출시키는 단계를 포함한다. 예시적인 높은 pH 조건은 특히, 샘플을 7.0 초과인 pH, 예를 들어 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0 초과인 pH에 노출시키는 단계를 포함한다.
- [0145] 일부 구현예에서, 샘플에 응력을 가하는 단계는 샘플을 광에 노출시키는 단계를 포함한다. 광에 대한 노출은 임의의 파장, 또는 임의의 범위의 파장을 갖는 광에 노출시키는 것을 포함할 수 있다. 예시적인 구현예에서, 샘플은 쿨 화이트 형광 광 또는 근자외선 광에 노출된다. 예시적인 쿨 화이트 형광 광은 약 4,100 내지 약 4,500 켈빈(K)의 상관 색온도(CCT)를 갖는 혼합된 파장의 광을 포함한다. 일부 양태에서, 쿨 화이트 형광 광은 4,100 K의 CCT를 갖는다. 일부 양태에서, 샘플을 광에 노출시키는 단계는 샘플을 쿨 화이트 광에 약 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9 또는 3.0백만 렉스 시간 동안 누적 노출시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 샘플을 광에 노출시키는 단계는 샘플을 쿨 화이트 광에 약 120만 또는 약 240만 렉스 시간 동안 누적 노출시키는 단계를 포함한다. 예시적인 근자외선 광은 약 300 nm 내지 약 400 nm의 파장을 갖는다. 일부 양태에서, 근자외선 광은 약 100 와트시/평방미터 내지 약 600 와트시/평방미터의 집적 에너지를 갖는다. 일부 양태에서, 근자외선 광은 약 100, 200, 300, 400, 500, 또는 600 와트시/평방미터의 집적 에너지를 갖는다.
- [0146] 기준 샘플과 이의 응력이 가해진 버전 사이의 주 피크 면적의 감소는, 예를 들어 관심 단백질의 주 피크가 분해를 통해 감소함을 나타내는 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 관심 단백질의 주 피크 면적은 응력이 가해지지 않은 관심 단백질의 주 피크와 비교해 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 또는 적어도 40%만큼 감소된다. 유사하게, 기준 샘플과 비교하여 응력이 가해진 관심 단백질에서 저 분자량 피크 면적이 증가하는 것은, 분해 산물을 나타내는 관심 단백질의 저 분자량 종의 풍부도가 증가할 때, 관심 단백질이 분해됨을 나타내는 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 응력이 가해진 관심 단백질의 적어도 하나의 저 분자량 피크 면적은 응력이 가해지지 않은 관심 단백질의 적어도 하나의 저 분자량 피크와 비교해 적어도 1%, 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 또는 적어도 40%만큼 증가한다.
- [0147] **키트 및 제조 물품**
- [0148] 본 개시는 본원에 기술된 탈당질화 방법 및 표지화 방법에 사용된 하나 이상의 개시된 완충제, 효소, 염료, 및 기준 표준을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 성분을 위한 용기를 포함할 수 있다. 완충제는 용액 형태 또는 동결 건조된 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 키트는 동결 건조된 제형을 위한 희석제 또는 재구성 용액이 담긴 제2 용기; 및 임의로, 용액 또는 재구성 용액의 사용 및/또는 동결 건조된 완충제 또는 분말 성분의 사용에 대한 지침을 포함한다.
- [0149] 본원에 기술된 키트는, 완충제, 희석제, 및 필터 중 하나 이상을 포함하여, 개시된 MCE 검정을 수행하는 데 필요한 추가 시약을 추가로 포함할 수 있다. 완충제 및 시약은 병, 바이알, 또는 시험관에 담길 수 있다.

[0150] 일부 구현예에서, 키트는 사용 지침을 포함한다.

[0151] 본 설명은 다수의 예시적인 구성, 방법, 파라미터 등을 제시한다. 그러나, 이러한 설명은 본 개시의 범위에 대한 제한으로서 의도된 것이 아니라, 대신에 예시적인 구현예의 설명으로서 제공된다는 것을 인식해야 한다.

[0152] 실시예

[0153] 실시예 1: 시약

[0154] 물질 및 장비

표 1

물질 (등가물이 사용될 수도 있음)	
항목	벤더 정보 및 취급
Safe-Lock Eppendorf 튜브, 1.5 mL	VWR, 카탈로그 # 21008-959 또는 20901 548
96-웰 로우 스크트 플레이트	BioRad PN HSP-9621
Millipore Ultrafree MC GV Durapore PVDF 0.22 $\mu$ M, 또는 National 마이크로-원심분리 필터, 비멸균	카탈로그 UFC30GVNB 또는 Thermo Scientific (VWR 카탈로그 66064-450)
TX761 면봉	VWR PN TWIX761
VWR® 내열성 폴리프로필렌 필름, 레이즈드-립 플레이트용	PN 89087-69
보풀 없는 천	Wypall L40 PN Os701/7471
VWR 시약 저장조	VWR 89094-674
Nalgene® 병 상단 필터, PES 막, 멸균	Thermo Scientific (VWR73521-002)
Protein Express LabChip, LabChip® GXII, LabChip® GXII Touch™ HT	PN 760499 또는 760528; 사용할 때까지 2~8°C에서 보관할 것. 칩을 처음 사용하기 전에 실온에서 30분 동안 가온할 것. 실온에 노출된 후, 칩의 유효 기간은 30일로 정할 것.

표 2

화학물질 (등가물을 사용할 수도 있음)	
화학물질	벤더 정보 및 취급
MilliQ 정제수	-
단백질 기준 표준	기준 표준은 검정 또는 실험 프로그램에 특이적이거나, 범용일 것.
0.2 M 인산나트륨 pH 8.0	VWR 카탈로그 번호 J62733
10X 환원제 (0.5 M 디티오프레이톨)	Novex Life Technologies PN NP0009; 받은 후 1 mL 분취량으로 소분하여 2 내지 8°C에서 보관할 것. 각 바이알은 반드시 1회용이어야 하고, 유효 기간은 6개월로 정할 것.
요오드아세트아미드(IAM)	Sigma, A3221-10VL; Sigma, I1149 (MW 184.96) (2 내지 8°C에 고형분으로서 저장할 것)
Pico 단백질 시약 키트	Perkin Elmer PN 760498; 키트 내용물 (전반적으로 표시되고 사용되는 바이알 캡 색상): - Pico 5X 표지 완충액 (1 바이알) (투명) - 동결건조된 표지 염료 (4바이알) (청색) - 샘플 완충제 (5 바이알) (백색) - 단백질 겔 매트릭스 (2 바이알) (적색) - 단백질 사다리 (1 바이알) (황색) - 하부 마커 (1 바이알) (녹색) - 세척 완충액 (4 바이알) (자주색) - 종료 완충액 (1 바이알) (주황색) - DMSO (디메틸 설펝사이드) (1 바이알) (갈색) 동결건조된 표지 염료를 제외한 모든 시약은 재구성 시까지 2°C 내지 8°C에서 보관되고, 동결건조된 표지 시약은 $\leq$ -20°C에서 보관된다. 키트는 사용 전 최소 30분 동안 실온에서 유지시켜야 한다.

인산일수소나트륨 일수화물	Sigma Aldrich 카탈로그 번호 71504; (MW 137.99) 실온에서 보관
인산이수소나트륨 칠수화물	Sigma Aldrich 카탈로그 번호 S2429; (MW 268.07) 실온에서 보관
도데실 황산리튬 (LDS)	Sigma Aldrich 카탈로그 번호 L9781; (FW 272.33) (실온에서 보관)
70% 이소프로판올 (VWR 89108-160) 또는 이소프로판올	세정용 (실온에서 보관)

표 3

[0157]

장비	벤더 정보 및 취급
적절한 부피의 피펫 및 벤더 팁 또는 이와 동등한 것	VWR, Rainin 또는 Gilson
마이크로원심분리기 Eppendorf 모델 5424 또는 이와 동등한 것	-
96-웰 플레이트 또는 이와 동등한 것이 장착된 플레이트 원심분리기 모델 5804	-
Eppendorf 튜브용 Eppendorf Thermomixer 또는 Eppendorf Nexus Master Cyclor, 96-웰 플레이트용 Flex 뚜껑 또는 이와 동등한 것 포함	-
Lab Chip GXII Perkin Elmer 또는 Lab Chip GXII Touch HT	-
와동기 또는 이와 동등한 것	-
진공 흡인 구성 또는 이와 동등한 것	실시에 환경 - 플라스틱 튜브의 제1 부분에 부착된 1000 µL 피펫 팁; 마개가 있는 Erlenmeyer 플라스크 액체 저장조로에 부착된 튜브; 플라스크를 진공원에 부착하는 제2 튜브. 피펫 팁은 각 세정 단계(예: 흡입 패스, 시퍼 시험) 후에 교체함

표 4

[0158]

시약 용액	제조
비환원 용액: - 272 µL 1M IAM - 1328 µL 100 mM 인산나트륨 1% LDS, pH 6 - 40 µL MilliQ 정제수	벌크 용액으로 제조하고 와동시켜 혼합함
1M IAM (요오드아세트아미드)	56 mg의 IAM이 담긴 바이알에 303 µL의 MilliQ 정제수 첨가. 완전히 용해될 때까지 와동시킴. 신선하게 제조함.
환원 용액: - 476 µL 10 x 환원제 - 1162 µL 100 mM 인산나트륨 1% LDS, pH 9 - 42 µL MilliQ 정제수	벌크 용액으로 제조하고 와동시켜 혼합함
희석된 종결 용액: - 2.5 µL 종결 완충액 (주황색 캡) - 17.1 µL 샘플 완충액 (백색 캡) - 85.4 µL MilliQ 정제수	Pico 단백질 시약 키트의 종결 완충액 및 샘플 완충액
5 µM 염료: - 10 µL의 100 µM 염료 (-20°C에서 보관된 동결분취액) - 190 µL MilliQ 정제수	5 µM 염료 용액을 고속 설정으로 와동시켜 용해시킴.

100 μM 염료:	- 동결 건조된 표지 염료(청색 캡, Pico 단백질 시약 키트)를 15,000 rpm으로 1분 동안 회전시킴. - 240 μL의 DMSO 첨가 - 고속 설정으로 와동시켜 완전히 용해시킴.
200 mM 인산일수소나트륨 일수화물	- 5.5 g의 인산일수소나트륨 일수화물을 200 mL의 MilliQ 정제수에 첨가. - 용해될 때까지 혼합하고 0.22 μm 병 상단 필터를 통해 여과함.
200 mM 인산이수소나트륨 칠수화물	- 10.7 g의 인산이수소나트륨 칠수화물을 200 mL의 MilliQ 정제수에 첨가. - 용해될 때까지 혼합하고 0.22 μm 병 상단 필터를 통해 여과함.
10% LDS (도데실 황산나트륨)	- 1 g의 LDS를 8 mL의 MilliQ 정제수에 용해시키고, 총 10 mL의 부피까지 MilliQ 정제수로 QS함. - 0.22 μm 병 상단 필터를 통해 여과함.
100 mM 인산나트륨 1% LDS, pH 6 - 8.18 mL 200 mM 인산일수소나트륨 일수화물 - 1.82 mL 200 mM 인산이수소나트륨 칠수화물 - 2 mL 10% LDS - 8 mL MilliQ 정제수	- 와동을 사용해 용액을 혼합함.
100 mM 인산나트륨 1% LDS, pH 9: - 10 mL 200 mM 인산이수소나트륨 칠수화물 - 2 mL 10% LDS - 8 mL MilliQ 정제수	- 와동을 사용해 용액을 혼합함.

표 5

[0159]

MCE 방법 요약			
MCE 방법	임상시험 계획서	설명	결과
방법 A	실시예 2	탈당질화가 없는 종래의 샘플 제조.	고도로 당질화된 단백질에 대한 피크 분리 없음; 안정성을 나타내지 않음; < 20kDa에서 유리 염료 간섭.
방법 B	실시예 3	염료 표지 전에 탈당질화	양호한 피크 분리; 3시간 탈당질화, PNGase F 피크 간섭, <20k Da에서 유리 염료 간섭.
방법 C	실시예 4	염료 표지 후 탈당질화	양호한 피크 분리; 프로파일에서 PNGase F 피크 없음; 10분 탈당질화, 10~20 kDa에서의 분리, 안정성을 나타냄.

표 6

[0160]

실시예에 사용된 단백질 요약					
단백질	사용된 실시예	사용된 도면	MW(백분 펩티드)	N-당질화의 횟수	설명
단백질 1	5, 6, 10	2~8, 14~15	49.4	8	이황화 연결된 재조합 (Fab') <sub>2</sub> -유사 트랩 단백질
단백질 2	7	9	48	8	단쇄 재조합 (Fab') <sub>2</sub> -유사 트랩 단백질
단백질 3	8	10~11	23	1	단리된 Fc 단편
단백질 4	9	12~13	145	2	IgG4 mAb

[0161] **실시예 2: 탈당질화가 없는 마이크로칩 모세관 전기영동을 위한 프로토콜(방법 A)**

[0162] 본 프로토콜은 순도 및 불순물 수준을 추정하기 위한 GXII 기기를 사용하는 비환원성(NR) 및 환원성(R) 마이크로칩 모세관 전기영동(MCE)에 의해 시험 단백질의 분석하기 위한 제조 방법을 기술한다. 이들 방법은 단백질 특성화에 사용되거나 단백질 샘플에서 단편화 수준을 결정하는 데 사용된다. 이들 종래의 방법은 탈당질화 없이 수행된다.

[0163] **절차**

[0164] 이 절차의 흐름 경로에 대한 정보에 한해서 도 1을 참조한다.

[0165] (1) **변성.** 단백질 기준 표준 또는 시험 물품을 물로 약 0.2~2.0 mg/mL까지 희석한다. 96-웰 플레이트에, 단백질 샘플 및 비-환원(NR)/환원(R) 용액을 4:1의 부피비로 첨가한다(부피는 달라질 수 있음). 폴리프로필렌 시일 플레이트를 밀봉하고, 최적화된 시간(일반적으로 1 내지 60분) 동안 단백질-특이적 변성 온도(일반적으로 50 내지 99°C)에서 플레이트를 가열한다.

[0166] (2) **표지화.** 표 4에 기술된 바와 같이 5 μM 염료를 제조한다. 변성된 단백질 용액에 5 μM 염료를 1:1의 부피 비율로 첨가한다(부피는 달라질 수 있음). 96 웰 플레이트를 35°C의 써모사이클러에서 30분 동안 가열한다. 표지화 반응을 퀸칭하기 위해, 105 μL의 희석된 종결 용액(표 4에 따라 제조됨) 및 5 μL의 표지된 단백질을 새로운 96 웰 플레이트에 첨가하고 잘 혼합한다.

[0167] (3) **GX-II에서의 실행.** MCE 기기 및 마이크로칩을 준비하고, 제조업체의 지침에 따라 측정을 수행한다.

[0168] **실시예 3: 단백질 표지 전에 탈당질화를 포함하는 마이크로칩 모세관 전기영동에 대한 프로토콜(방법 B)**

[0169] 이 방법은 MCE 측정을 거치기 전에 탈당질화가 필요한 당단백질에 적용된다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 프로토콜, 화학물질, 시약, 및 분석은 실시예 1~2에 기술된 것과 동일하다.

**표 7**

추가 시약	
시약	벤더 정보
PNGase F	New England BioLabs NEB #P0704L
GlycoBuffer 2 (10X) 완충제	New England BioLabs, #B3704
RapiGest SF 계면활성제	물, PN 186001861
중탄산암모늄(ABC)	Sigma (Fluka), Cat#: 40867

[0171] **절차**

[0172] (1) **탈당질화.** 총 100 μg의 단백질 샘플을 0.1% RapiGest SF로 90 μL로 희석한다. 단백질 중량은 UV 기반 방법에 의해 결정될 수 있다. 10 μL의 NEB PNGase F 모액을 첨가하여 100 μL의 탈당질화 혼합물을 만들고, 와동시키고, 회전시킨다. 37°C의 가열 블록 상에서, 혼합물을 400rpm으로 진탕하면서 3시간 동안 인큐베이션한다.

[0173] (2) **변성.** 실시예 2에 기술된 바와 같이 전술한 탈당질화된 샘플의 변성을 진행한다.

[0174] (3) **표지화.** 실시예 2에 기술된 바와 같이 변성된 샘플의 표지화를 진행한다.

[0175] (4) **GX-II에서의 실행.** MCE 기기 및 마이크로칩을 준비하고, 제조업체의 지침에 따라 측정을 수행한다.

[0176] **실시예 4: 단백질 표지 후 탈당질화가 포함된 마이크로칩 모세관 전기영동의 프로토콜(방법 C)**

[0177] 이 방법은 MCE 측정을 거치기 전에 탈당질화가 필요한 당단백질에 적용된다. 달리 명시되지 않는 한, 모든 프로토콜, 화학물질, 시약, 및 분석은 실시예 1~3에 기술된 바와 동일하다.

[0178] 단백질 표지 후 탈당질화에 대한 프로토콜의 다이어그램은 도 1에서 확인할 수 있다.

**표 8**

추가 시약	
시약	벤더 정보
Rapid™ PNGase F (비환원 포맷)	New England BioLabs NEB #P0710

5x Rapid™ PNGase F 완충액 (비환원 포맷)	New England BioLabs NEB #B0717S
---------------------------------	---------------------------------

[0180] 절차

[0181] (1) 변성. 실시예 2에 기술된 바와 같이 샘플을 희석하고 변성시킨다.

[0182] (2) 표지화. 표 4에 기술된 바와 같이 5 μM 염료를 제조한다. 5 μM 염료와 전술한 변성된 단백질 용액을 1:1의 부피 비율로 혼합한다. 예를 들어, 샘플의 부피가 10 μL인 경우, 10 μL의 5 μM 염료를 첨가한다. 96 웰 플레이트를 폴리프로필렌 시일로 밀봉하고, 써모사이클러에 넣고 35°C에서 30분 동안 가열한다. 표지 반응을 쿨링하기 위해, 미사용 96-웰 플레이트를 수득한다. 샘플 실행 설정에 따라 2.5 μL 종결 완충제(Pico 단백질 시약 키트의 주황색 캡 바이알, 키트의 원래 용액 사용)을 빈 플레이트의 웰에 첨가한다. 2.5 μL의 표지된 샘플을 종결 용액이 담긴 플레이트 웰에 옮긴다. 혼합 샘플을 각 웰에 피펫팅하고 최소 3분 동안 유지한다.

[0183] (3) 탈당질화각 웰에 3 μL MilliQ 정제수와 2 μL 5x Rapid™ PNGase 완충제(NEB로부터의 비환원 포맷)를 첨가하여 10 μL의 반응 부피를 만든다. 각 웰에 1~4 μL의 Rapid™ PNGase(NEB로부터의 비환원 포맷)를 첨가한다. 96 웰 플레이트를 폴리프로필렌 시일로 밀봉하고, 50°C의 써모사이클러에서 10~30분 동안 가열한다. 탈당질화 후, 각 웰에 17 μL 샘플 완충제(Pico 단백질 시약 키트의 백색 캡 바이알) 및 80 μL MilliQ 정제수를 첨가한다.

[0184] (4) GX-II에서의 실행. MCE 기기 및 마이크로칩을 준비하고, 제조업체의 지침에 따라 측정을 수행한다.

[0185] 실시예 5: 단백질 표지 전에, 고도로 당질화된 시알산 함유 단백질을 사용해 비-탈당질화와 탈당질화 비교

[0186] 단백질 1은 펩티드 질량 기준으로 크기가 49 kDa이고 8개의 예측 N-당질화 부위를 갖는 (주: 모든 부위가 당질화될 것으로 예상되는 않음) 이황화 결합된 재조합 융합 단백질이다.

[0187] 하나의 목표는 리서치 안정성 연구 및 품질 제어(QC) 연구를 위해 고도로 당질화된 시알산 함유 단백질(예: 단백질 1)의 저 분자량(LMW) 단편을 특성화하고 모니터링하기 위한 마이크로칩 모세관 전기영동 기반 방법을 개발하는 것이었다.

[0188] 단백질 1의 특성은 아래 표 9에 나타나 있다:

표 9

단백질 1 분자 특성	
글리칸이 포함되지 않은 분자량(온전한 MS)	49 kDa
글리칸이 포함된 분자량(SEC-MALS)	64 kDa
예측 N-연결된 당질화 부위	8

[0190] 약어: 온전한 MS, 온전한 단백질 질량 분광분석; SEC-MALS, 크기 배제 크로마토그래피 다각도 레이저 광 산란.

[0191] 탈당질화가 포함되지 않은 프로토콜(방법 A, 실시예 2)과 표지화 전에 탈당질화를 포함하는 프로토콜(방법 B, 실시예 3)의 비교는 도 1에 도시되어 있다. 방법 A 및 방법 B에 의해 생산된 단백질 1의 전기영동도 비교는, 비환원(NR) 조건의 경우 도 2에, 환원(R) 조건의 경우 도 4에 각각 도시되어 있다. NR 조건의 경우, (탈당질화가 포함되지 않은) 방법 A의 결과로서, 전기영동도에서 넓은 피크가 있었고, 피크 분리는 없었다(즉, 고분자량(HMW) 주 피크와 저분자량(LMW) 피크가 분리되지 않음). 또한, 피크 위치는 직교 방법에 기초하여 약 64 kDa에서 예상되는 것보다 훨씬 더 높은 분자량(MW) 영역(70~120 kDa)에서 나타났다. 단백질이 당질화되는 경우, MCE 검정은 크기를 정확하게 추정할 수 없고, 오차가 더 크다(Engel 등에 의해 문헌[Electrophoresis, 2015 Aug; 36(15):1754-8]에 기술됨). 또한, < 20 kDa에서 유리 염료 피크 간섭이 있었는데, 이는 20 kDa 미만의 임의의 LMW 피크를 마스킹할 수 있다.

[0192] 대조적으로, 표지화 전에 탈당질화가 이루어지는 방법 B의 결과로서(실시예 3), 피크들(주 피크, HMW 피크, LMW 피크) 간의 피크 분리가 존재하고 베이스라인이 분리된다. 주 피크는 예상 MW(약 49 kDa)에 가깝게 나타났다. 프로토콜은 안정성을 나타내며, 분자 크기 추정이 더 정확하다. 그러나, 방법 B의 프로토콜은 또한 3시간의 탈당질화를 필요로 하는데, 이는 검정의 전체 처리량을 제한한다. 또한, PNGase 피크(약 36 kDa)는 LMW 1 및 2 피크(단백질 1의 단편으로부터의 불순물 피크)와 간섭한다. 특히 열적 안정성이 가해진 단백질 1 샘플의 경우, LMW

1 피크는 증가하고 확장되어, PNGase 피크와 병합된다(도 3). 근접한 또 다른 아티팩트는 < 20 kDa에서의 유리 염료 피크 간섭이다. 이들 아티팩트의 조합은 불순물을 정량화할 때 부정확한 통합을 초래할 수 있고, 안정성을 나타내는 검정의 능력을 제한한다.

- [0193] 환원 조건에서 유사한 관찰이 발견되었다(도 4): 주 피크, LMW 피크, 및 HMW 피크의 정확한 크기 추정, 분리, 및 해상도를 위해 당단백질의 탈당질화가 요구된다.
- [0194] **실시예 6: 단백질 표지 후에, 고도로 탈당질화된 시알산 함유 단백질을 사용한 탈당질화**
- [0195] 표지화 전에 탈당질화를 포함하는 프로토콜(방법 B)와 표지화 후에 탈당질화를 포함하는 프로토콜(방법 C)의 비교가 도 1에 도시되어 있다.
- [0196] 표지화 후 탈당질화를 포함하는 프로토콜을 개발하기 위해, 탈당질화 반응 조건을 최적화하였는데, 이는 탈당질화된 피크의 불완전한 제거가 30분의 탈당질화 반응 초기에 관찰되었기 때문이다. 단백질 1의 최적의 탈당질화를 결정하기 위해 온도, 시간, 농도, 및 완충제 조건을 변화시켰다.
- [0197] 단백질 1의 NR 전기영동도에서 불완전하게 탈당질화된 피크를 제거하기 위한 최적화를 통해 프로토콜에 대해 몇 가지를 개선하였다. 여기에는 NEB Rapid™ PNGase F를 사용하여 상승된 온도 50°C에서 10분 동안 탈당질화를 수행하는 것(통상적인 PNGase F를 사용하면 37°C에서 3시간 동안 인큐베이션 해야 함), 엔도글리코시다아제 농도를 증가시키는 것, 및 NEB PNGase 키트의 당단백질 완충제를 첨가하는 것이 포함되었다.
- [0198] 실험에서 반응 시간의 증가는 탈당질화에서 명백한 개선을 나타내지 않았다. 도 5는 50°C에서 1 μL 또는 2 μL의 Rapid™ PNGase F(비환원 포맷, NEB P0711)와 함께 단백질 1을 사용하여 생성된 전기영동도를 도시하며, 반응 시간은 10분 내지 30분으로 다양하다. 도 5로부터 알 수 있는 바와 같이, 반응 시간이 10분을 초과했을 때에도 명백한 개선(즉, 불완전하게 탈당질화된 피크의 감소)은 없었다.
- [0199] Rapid™ PNGase F 농도를 높였을 때 탈당질화가 개선되었다. 표지화 후 탈당질화를 위한 프로토콜을 사용하여, 1, 2, 3 또는 4 μL의 Rapid™ PNGase F를 탈당질화 반응에 첨가하고, 반응을 50°C에서 10분 동안 진행시켰다. 결과는 도 6 및 도 7에 도시되어 있다. 도 6의 삽도에서 알 수 있는 바와 같이, Rapid™ PNGase F의 농도를 증가시키면 단백질 1의 불완전한 탈당질화 솔더 피크가 감소한다.
- [0200] 1~4 μL의 Rapid™ PNGase F를 첨가함으로써 강력한 결과를 얻었다. 1, 2, 3 또는 4 μL의 Rapid™ PNGase F를 사용하여 탈당질화된 기준 단백질 1을 사용하여 생성된 전기영동도는 도 7에 도시되어 있다. 표시된 피크 아래의 면적을 Empower를 사용하여 통합하였고, 그 결과를 아래 표 10에 제공하였다.

**표 10**

[0201]

상이한 양의 Rapid™ PNGase F를 사용하여 생성된 단백질 1 피크의 통합				
Rapid™ PNGase	LMW2-5	LMW 1	MP	HMW
1 μL	2.27	4.09	93.01	0.62
2 μL	1.94	4.23	93.24	0.60
3 μL	1.71	4.05	93.75	0.50
4 μL	1.78	4.10	93.38	0.75
RSD (%)	12.95	1.90	0.33	16.64

- [0202] RSD(%)는 상대 표준 편차 백분율을 나타낸다.
- [0203] 통합 결과는, Rapid™ PNGase F 농도가 더 높을 때 관찰된 주 피크 후의 솔더 피크가 감소하였지만(불완전하게 탈당질화된 단백질 1), 주 피크(MP)의 통합 총 백분율은 약 3 μL에서 가장 높은 값을 가졌음을 보여주었다. 1 μL 내지 4 μL의 PNGase에서 MP에 대한 RSD(%)는 0.33%였는데, 이는 반응 당 1~4 μL의 Rapid™ PNGase F 농도를 사용하면 강력한 결과가 얻어진다는 것을 시사한다. 이러한 경향에 따라, 더 많은 Rapid™ PNGase를 사용하는 것이 유사한 결과를 제공할 것으로 예상된다.
- [0204] 표지화 후에 탈당질화가 이루어지는 방법 C는 이러한 MCE 검정이 정밀하면서 안정성을 나타낼 수 있게 한다. 단백질 용액을 37°C에서 4주 동안 유지하여 단백질 1에 응력을 가하고(“RS” 또는 응력이 가해지지 않은 기준 표준과 비교하여, 표 11 및 12의 응력이 가해진 기준 표준, 또는 “SRS”, “37°C 4w”), 본원에 기술된 표지화 프로토콜 및 MCE에 따라 탈당질화를 사용하여 검정하였다. 응력이 가해진 이 단백질 1을 응력이 가해지지 않은 단백질 1과 비교하였다(시간은 0, 또는 t0과 동일함, 즉 37°C 유지 없음). 응력이 가해진 단백질 1과 응력이 가

해지지 않은 단백질 1에 대한 전기영동도를 생성하였고(도 8), 표시된 피크를 Empower를 사용하여 통합하였다. 측정을 3회 반복하였으며(S1~S3), 그 결과를 아래 표 11 및 12에 나타냈다.

**표 11**

[0205]

표지 후 탈당질화 프로토콜을 사용해 응력이 가해진(SRS) 단백질 1과 응력이 가해지지 않은(RS) 단백질 1의 비교									
응력		LMW5 (%)	LMW4 (%)	LMW3 (%)	LMW2 (%)	LMW1 (%)	MP (%)	HMW1 (%)	HMW2 (%)
RS (t0)	S1	0.11	0.20	0.75	0.81	4.22	93.36	0.54	-
	S2	0.07	0.17	0.70	0.80	4.22	93.57	0.48	-
	S3	0.12	0.17	0.73	0.81	4.21	93.38	0.57	-
SRS (37°C, 4w)	S1	0.08	0.64	0.71	1.37	5.46	89.25	2.34	0.15
	S2	0.10	0.63	0.71	1.39	5.52	89.25	2.19	0.20
	S3	0.16	0.68	0.68	1.35	5.45	89.63	1.87	0.18

**표 12**

[0206]

응력이 가해진 단백질 1 및 응력이 가해지지 않은 단백질 1(N=3)의 상대 표준 편차 백분율(RSD(%))				
		LMW (%)	MP (%)	HMW (%)
RS (t0)	평균	6.03	93.36	0.54
	RSD (%)	1.20	0.10	8.6
SRS (37°C, 4w)	평균	8.31	89.38	2.31
	RSD (%)	0.55	0.25	9.98
	차이	2.28	-4.1	1.8

[0207]

RS 및 SRS의 3회 반복 측정은, 다수의 LMW 및 HMW 피크가 실행 사이에서 일관되게 식별되고, LMW 및 MP 피크에 대해 1% 미만의 RSD로 통합되었음을 보여주었다. RS와 SRS 간의 모든 변화는 유의미했다. 방법 C(도 8)에 의해 제조된, 응력이 가해진 단백질 1 및 응력이 가해지지 않은 단백질 1로부터의 전기영동도의 비교는, 이러한 방법이 정밀하고 안정성을 나타낸다는 것을 나타냈다. 염료 표지 전에 PNGase F로 탈당질화를 수행할 때(방법 B), PNGase F 피크는 전기영동도 프로파일에서 육안으로 보이고, LMW 1 및 LMW 2 피크와 간섭한다. 긴 탈당질화 시간(3시간)이 사용된 후, 유리 염료 간섭이 있다(<20 kDa).

[0208]

염료로 표지한 후 Rapid™ PNGase F로 탈당질화를 수행할 때(방법 C), 전기영동도에서 PNGase 피크가 육안으로 보이지 않는다. 탈당질화는 신속하고 완전하다(예: 10분 내). MP 피크, HMW 피크, 및 LMW 피크의 해상도는 유리 염료 간섭을 최소화하면서 약 10 kDa 영역까지 달성된다(예를 들어, 도 8에서, LMW 5 피크는 11 kDa이고, 유리 염료 피크 아티팩트로부터 분리된 베이스라인임).

[0209]

요약하면, 방법 C와 같은 염료 표지화 후 탈당질화를 사용하는 MCE 방법은 분리가 양호하며, 안정성을 나타내고, 처리량이 높고, 재현 가능하며, PNGase F 피크 간섭 및 유리 염료 간섭으로부터 검정 아티팩트를 회피한다. 상기 방법은 또한 양호한 정밀도, 선형성, 및 견고성을 나타낸다. 이들 검정은 품질 제어 목적에 적합한 플레이트 기반 고 처리량 포맷으로 사용될 수 있다.

[0210]

**실시예 7: 단백질 2를 사용하여 탈당질화로 및 탈당질화 없이 생성된 MCE 결과의 비교**

[0211]

단백질 2는 다음 링커 서열에 의해 연결된 리간드 결합 도메인을 포함하는 단쇄 융합 단백질을 포함하는 단쇄 재조합 (Fab')<sub>2</sub>-유사 단백질이다: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG (서열번호 1). 단백질은 48 kDa(캡티드 백본)의 예측 분자량을 갖는다. 단백질 2는 8개의 N-당질화 부위를 갖는다.

[0212]

단백질 2에 대한 MCE 전기영동도는 비환원 조건과 환원 조건 모두에서, 탈당질화가 없는 프로토콜(방법 A, 실시예 2) 및 표지화 후 탈당질화(방법 C, 실시예 4)를 사용해 생성하였다. 도 9에서 알 수 있는 바와 같이, 탈당질화가 없을 때, 분리가 없는 넓은 피크만이 MW 영역(90~140 kDa)에서 나타났는데, 이는 이론적 값(약 48 kDa)보다 훨씬 더 컸다. 반대로, 탈당질화는 예상 MW(48 kDa)에 가까운 주 피크를 생성하였고, LMW 피크들을 명확하게 분리하였다. 또한, PNGase 피크(약 36 kDa)는 전기영동도에서 나타나지 않았다.

[0213]

**실시예 8: 단백질 3를 사용하여 탈당질화로 및 탈당질화 없이 생성된 MCE 결과의 비교**

[0214]

단백질 3은 재조합 시스테인 프로테아제에 의해 특정 부위에서 절단된 재조합 인간 IgG 1 Fc 서브유닛이다. 단

백질은 23 kDa의 예측 분자량을 갖는다. 단백질은 하나의 N-당질화 부위를 갖는다.

[0215] MCE 전기영동도는 비환원 조건 하에, 탈당질화가 없는 프로토콜(방법 A, 실시예 2) 및 표지화 후 탈당질화(방법 C, 실시예 4)를 사용해 생성하였다. 결과는 도 10에서 알 수 있다. 비-탈당질화 프로파일에서, 원래 샘플에서의 비-당질화된 모집단(MP1, 좌측) 및 당질화된 모집단(MP 2, 우측)을 나타내는 2개의 주 피크(MP)가 발견되었다. 탈당질화된 프로파일에서, 비당질화된 피크만이 관찰되었고, 여러개의 HMW 피크가 분리되었다. 동일한 비교를 환원 조건 하에서도 수행하였다(도 11).

[0216] **실시예 9: 단클론 항체의 안정성 평가**

[0217] 단백질 4는 분자량이 145 kDa이고 2개의 N-연결된 당질화 부위를 갖는 인간 IgG4-계열 단클론 항체이다.

[0218] 탈당질화가 없는 프로토콜(도 12 및 도 13의 방법 A) 및 표지화 후 탈당질화가 포함된 프로토콜(도 12 및 도 13의 방법 C)을 사용하여 제조된 단백질 4 샘플에 대해 MCE 전기영동도를 생성하였다. 비환원 조건(도 12) 및 환원 조건(도 13 참조) 모두에서 변성을 사용해 단백질을 검정하였다. 도 13에서 알 수 있는 바와 같이, 탈당질화는 글리칸을 제거한 결과로서 더 낮은 분자량에서 당질화된 주 피크(GMP)를 탈당질화된 주 피크(DGMP)로 이동시킨다. 도 13에서, 탈당질화된 중쇄(DGHC)와 당질화된 중쇄(FGHC)를 비교함으로써 알 수 있듯이, 탈당질화는 중쇄(HC) 피크의 크기를 감소시킨다.

[0219] **실시예 10: 광 응력이 가해진 단백질 1의 안정성 평가**

[0220] 단백질 용액을 쿨 화이트(CW) 형광 램프 광 하에 120만 렉스 시간 및 240만 렉스 시간(MLH) 동안 누적 노출시키거나(도 14), 200 와트시 및 400 와트시/평방 미터의 에너지를 갖는 통합된 근자외선(UVA) 하에 노출시켜(도 15), 단백질 1에 광 응력을 가했다. 실시예 1 및 4에 기술된 바와 같이 표지화 후 탈당질화 프로토콜(방법 C) 및 MCE를 사용해 샘플을 검정하였다. 응력이 가해진 단백질 1 샘플을 (알루미늄 호일로 덮은 것을 제외하고는 동일한 조건 하에서 배양된) 응력이 가해지지 않은 단백질 1 샘플과 비교하였다. 응력이 가해진 단백질 1과 응력이 가해지지 않은 단백질 1에 대한 전기영동도를 생성하였고, 표시된 피크를 Empower를 사용하여 통합하였다. 결과를 표 13에 나타냈다. CW 및 UVA 노출 둘 다는 LMW 피크를 약간 증가시켰고, HMW 피크의 상당히 증가시켰는데, 이는 광에 의해 개시된 공유-결합 이량체 및 다량체의 형성으로 인한 것일 수 있다. 결과는 이 방법이 안정성을 나타내며, 응력 조건 하에서 단백질의 단편화 및 공유 결합된 HMW 형성을 평가할 수 있음을 보여준다.

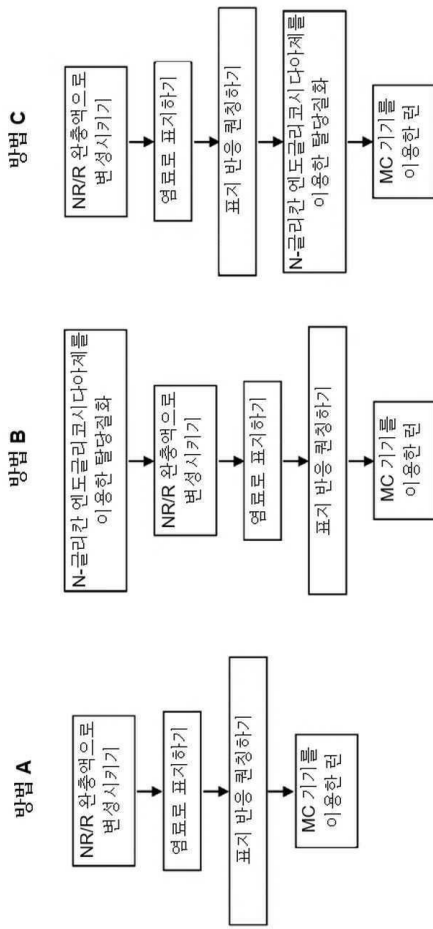
표 14

[0221]

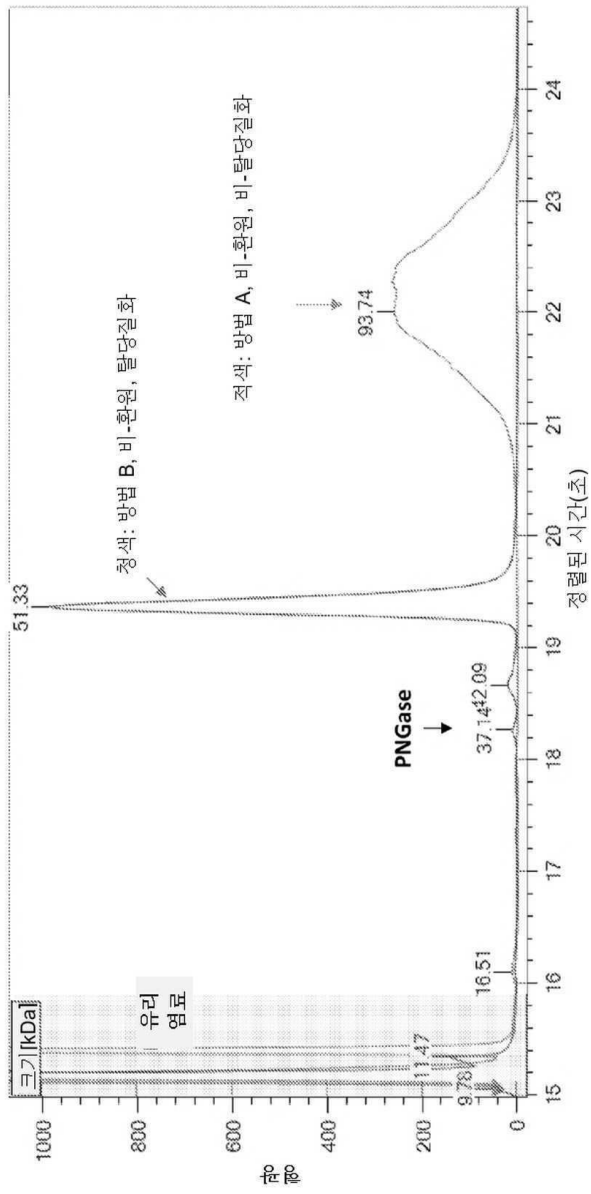
표지 후 탈당질화 프로토콜(방법 C)을 사용해 응력이 가해진 단백질 1과 응력이 가해지지 않은 단백질 1의 비교			
광 응력 조건	LMW (%)	MP (%)	HMW (%)
응력이 가해지지 않음	5.01	93.61	1.38
CW 120만 렉스 시간	6.61	77.27	16.12
CW 240만 렉스 시간	7.54	69.96	22.50
UVA 200 와트시/m <sup>2</sup>	6.48	84.92	8.60

도면

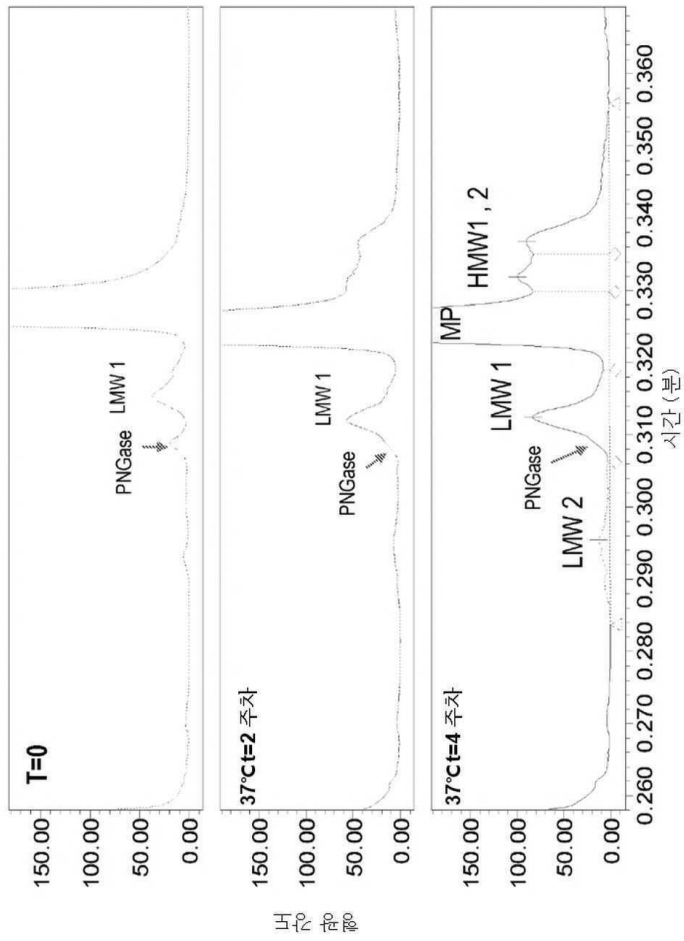
도면1



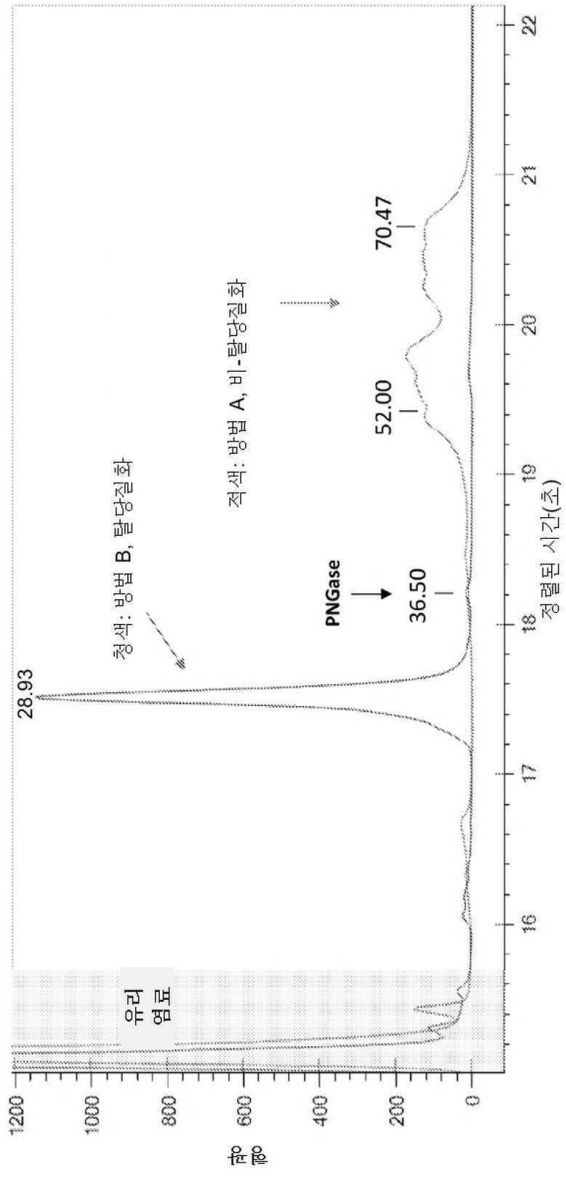
도면2



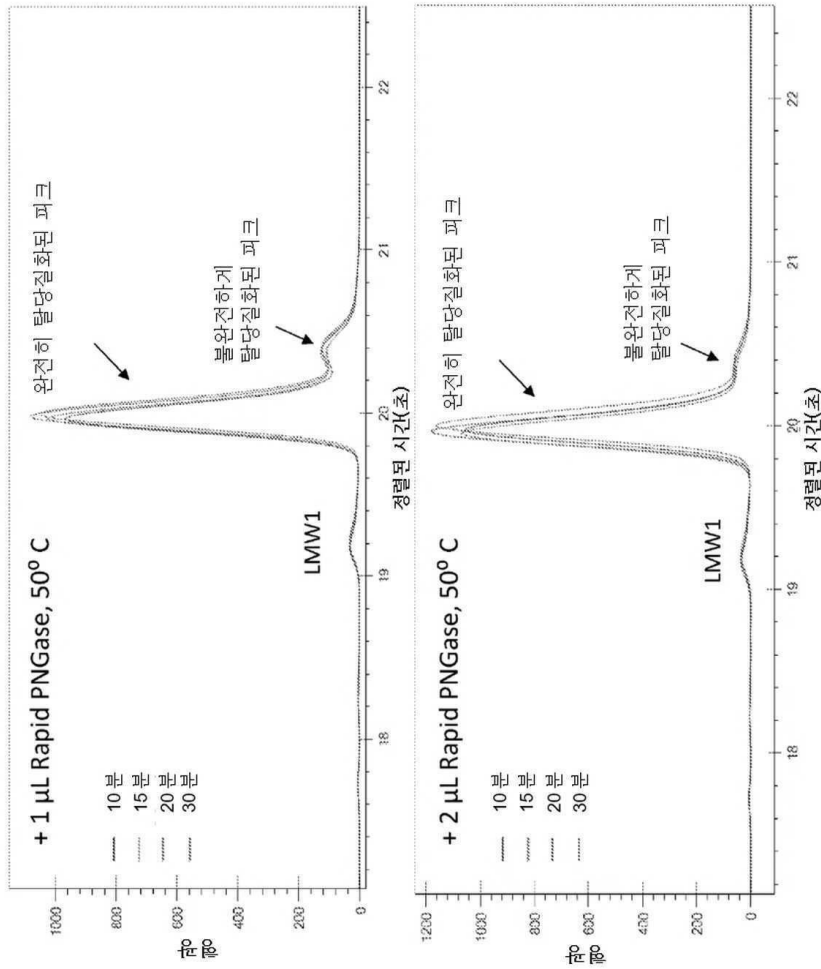
도면3



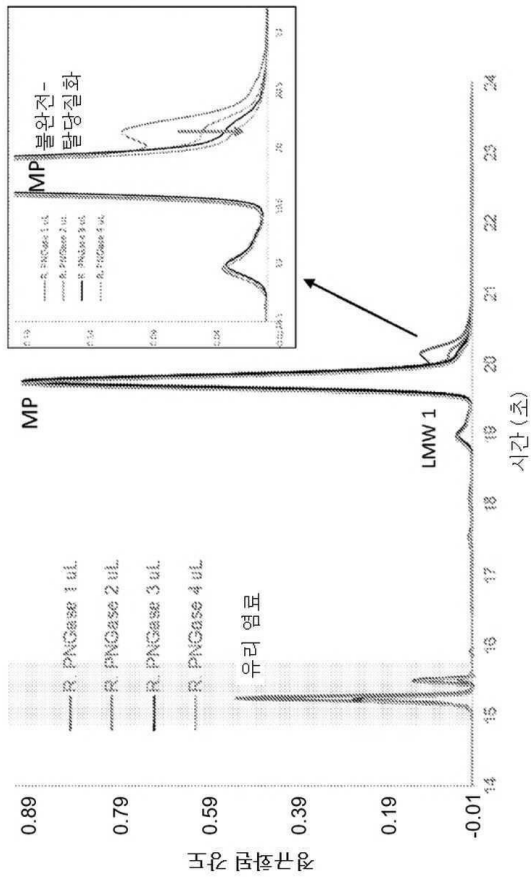
도면4



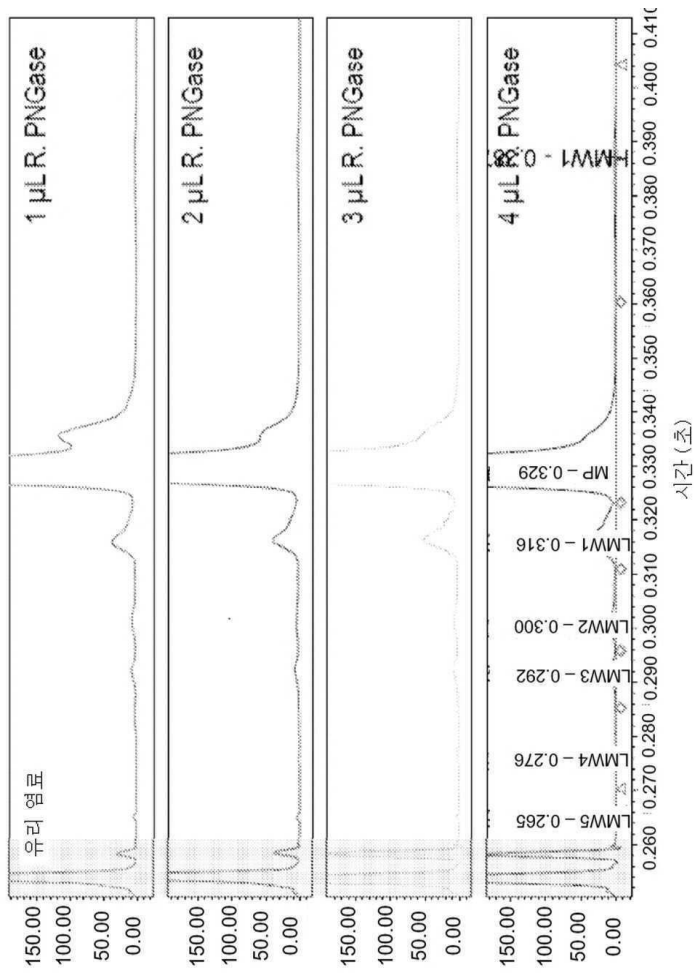
도면5



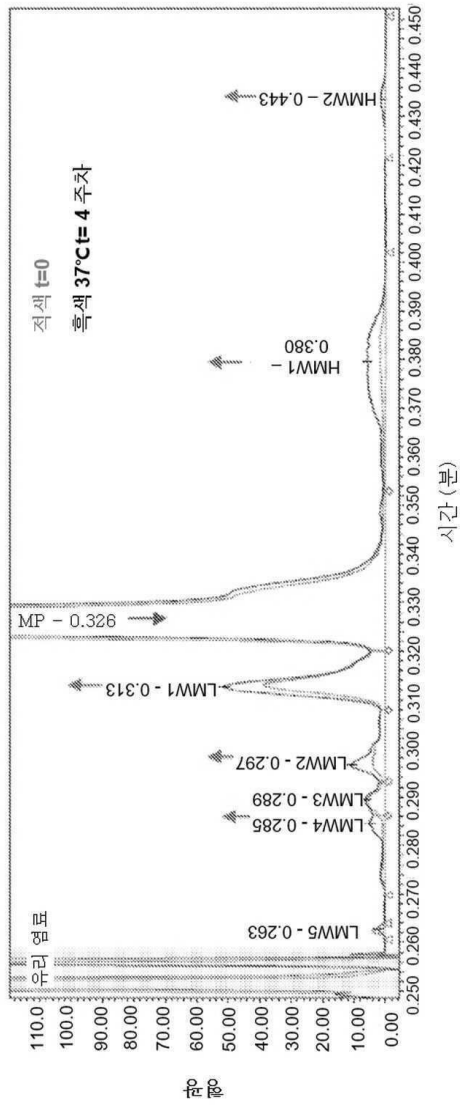
도면6



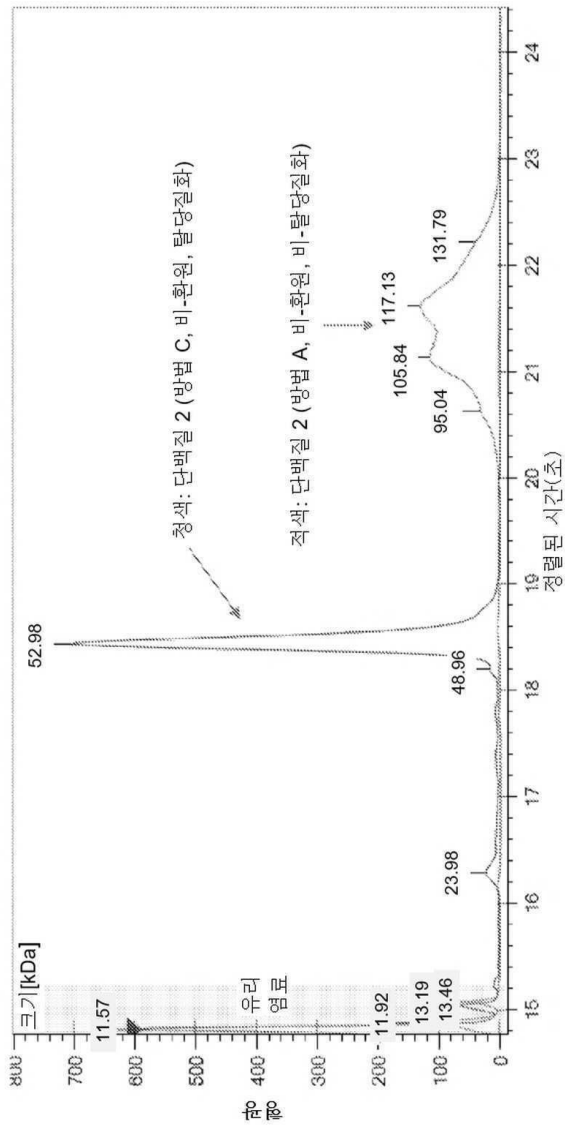
도면7



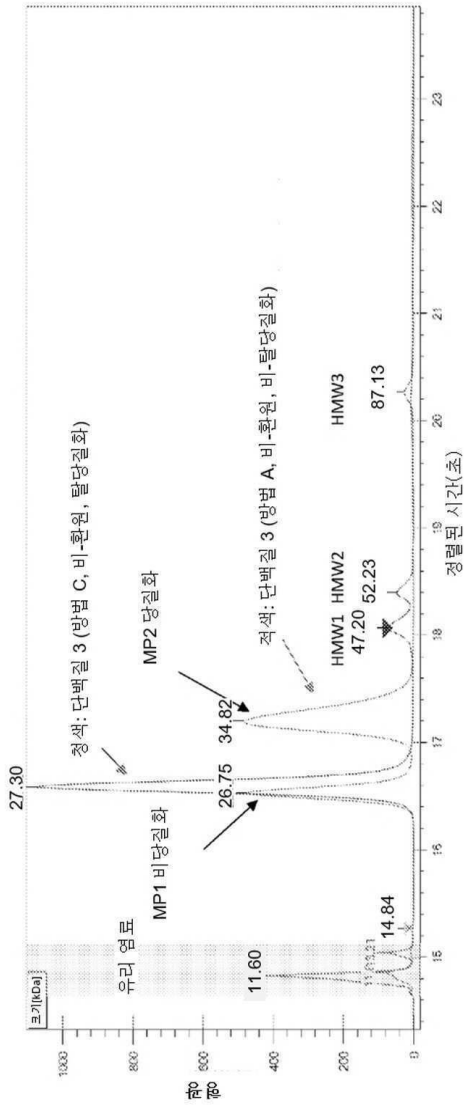
도면8



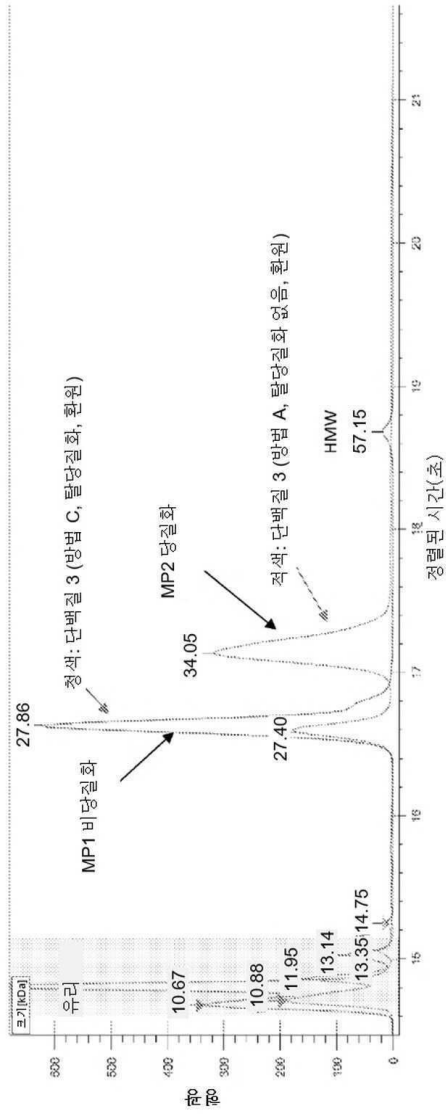
도면9



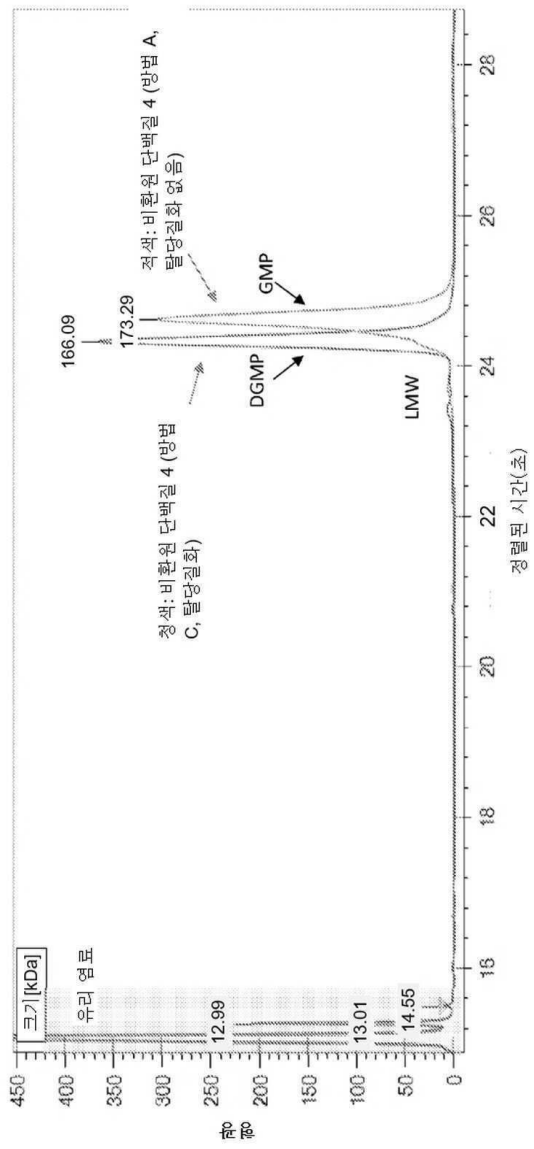
도면10



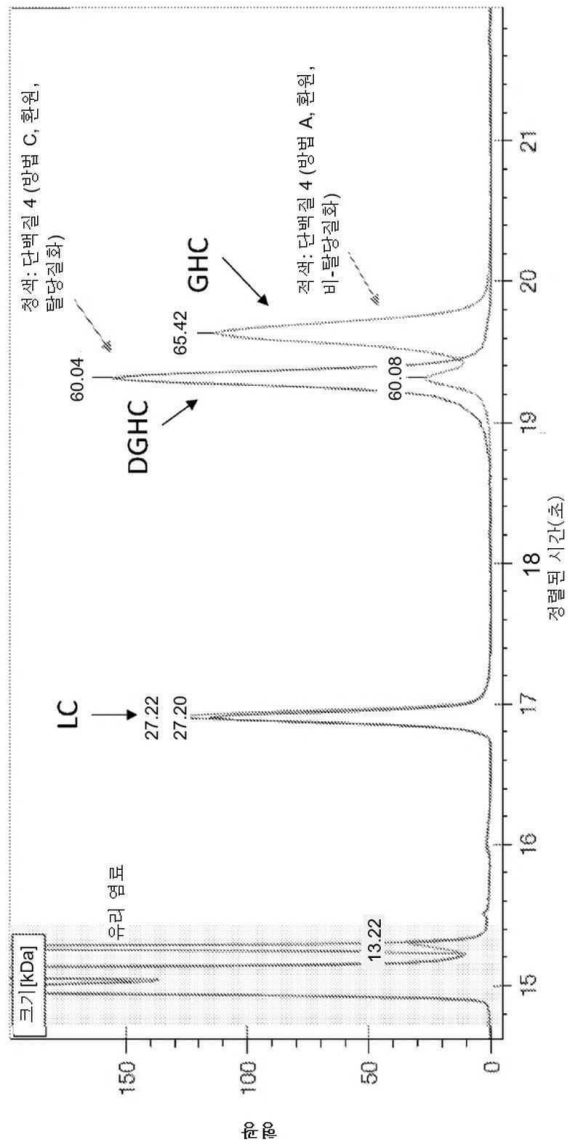
도면11



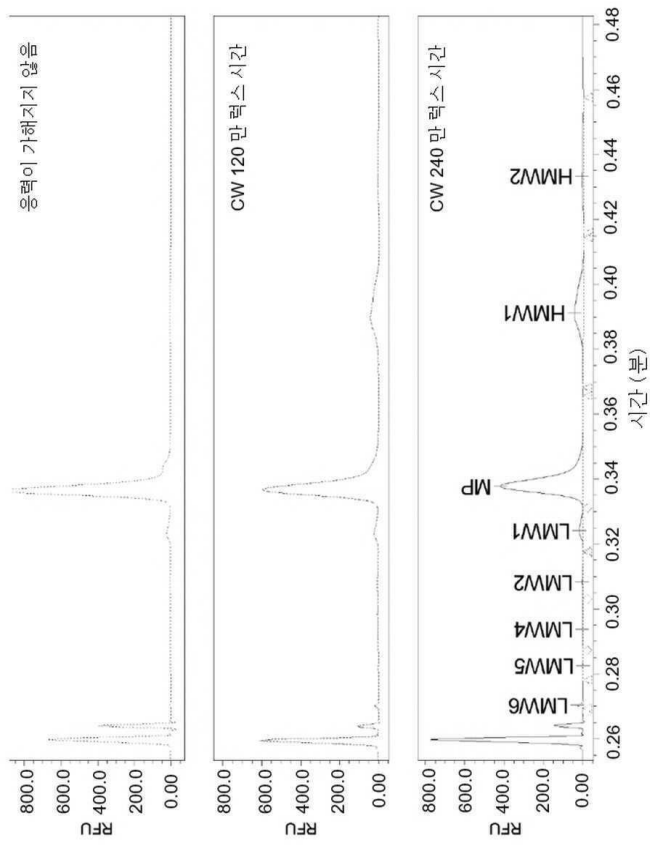
도면12



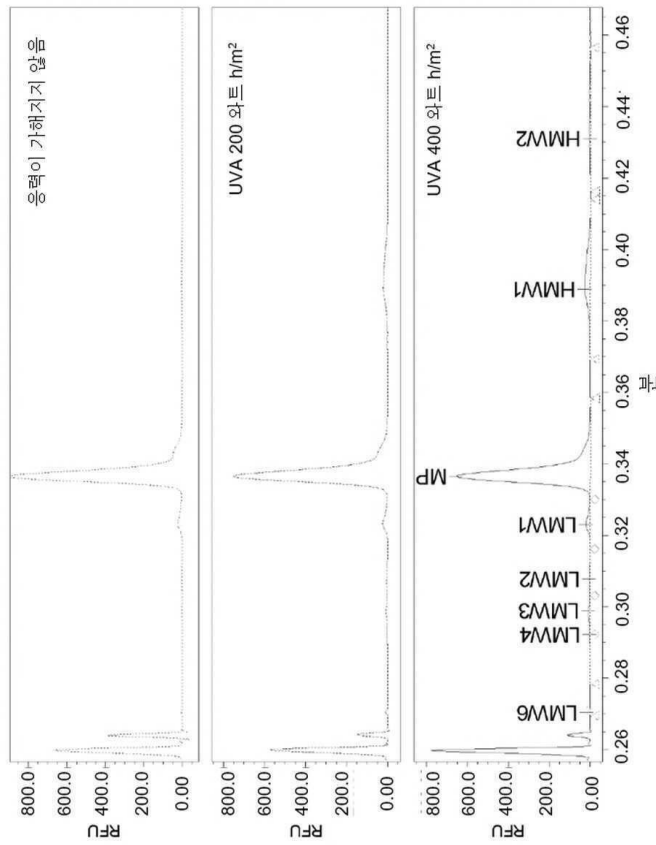
도면13



도면14



도면15



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

Zhao, Yiming

Chen, Hunter

Wang, Shao-Chun

Riehlman, Timothy

Carreau, Gabriel

Wang, Ying

<120> Deglycosylation Methods for Electrophoresis of Glycosylated Proteins

<130> REGE-019/001WO 181937-2307

<150> 62/963,646

<151> 2020-01-21

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 1

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1                    5                    10                    15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

20                    25                    30