



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

(21)(22) Заявка: 2012138298/15, 16.02.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
18.02.2010 EP 10001645.0

(43) Дата публикации заявки: 27.03.2014 Бюл. № 9

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 18.09.2012(86) Заявка РСТ:
EP 2011/052282 (16.02.2011)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2011/101370 (25.08.2011)Адрес для переписки:
191186, Санкт-Петербург, а/я 230, "АРС-
ПАТЕНТ", И.И. Липатовой

(71) Заявитель(и):

Ф.ХОФФМАН-ЛЯ РОШ АГ (СН)

(72) Автор(ы):

**КОЛЛЬ Ханс (DE),
РЕГУЛА Йёрг Томас (DE),
ВИГЕСХОФФ Франк (DE),
ЦЕХ Анне (DE)****(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВАРИАНТОВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛИПЕПТИДОВ****(57) Формула изобретения**

1. Способ определения полипептида с мутантной аминокислотной последовательностью, включающий следующие стадии:

- a) предоставление по меньшей мере двух образцов полипептида,
- b) инкубация каждого из образцов с одной и той же протеазой,
- c) анализ инкубированных образцов путем применения двумерного анализа данных с использованием комбинации обращенно-фазовой распределительной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрического анализа и/или MS/MS-анализа,
- d) установление набора данных, полученного для одного из образцов на стадии c), выбранного в качестве образца сравнения, и сравнение наборов данных, полученных для других образцов на стадии c), с набором данных для образца сравнения, при этом любое различие аминокислотной последовательности с соотношением интенсивности сигнала масс-спектра исследуемого образца и интенсивности сигнала масс-спектра образца сравнения, составляющим более чем 3, представляет собой мутацию аминокислотной последовательности данного полипептида, и тем самым определение полипептида с мутантной аминокислотной последовательностью.

2. Способ по п.1, где ширина интервала m/z для сравнения образцов составляет 1,6 или более.

3. Способ по п.1, дополнительно включающий стадию:

- e) определения идентичности и положения аминокислотных мутаций в

аминокислотной последовательности посредством MS/MS-анализа.

4. Способ по п.1, где предоставлен дополнительный образец, содержащий указанный полипептид, дополненный полипептидом с известной вариацией (мутацией) аминокислотной последовательности, и этот дополнительный образец инкубируют, анализируют и сравнивают наряду с предоставленными образцами.

5. Способ по п.1, где приготовление образцов осуществляют при величине рН меньше рН 8,0 и при температуре меньше 40°C.

6. Способ по п.1, где образцы предоставлены в трис(гидроксиметил)аминометановом буфере.

7. Способ по п.1, где инкубация образцов с протеазой приводит к расщеплению указанного полипептида протеазой на фрагменты аминокислотных последовательностей, длина которых составляет 3-60 аминокислотных остатков.

8. Способ по п.1, где сравнение на стадии d) выполняют с использованием данных для одного, нескольких или всех MS-зарядовых состояний.

9. Способ по п.1, где полипептид представляет собой иммуноглобулин, фрагмент иммуноглобулина или иммуноглобулиновый конъюгат.

10. Способ по п.1, где образцы инкубируют с протеазой в течение от 16 часов до 18 часов и после этого добавляют муравьиную кислоту или трифторуксусную кислоту.

11. Способ по п.1, где образцы инкубируют с протеазой в течение 4 часов и после этого добавляют муравьиную кислоту или трифторуксусную кислоту.

12. Способ по п.1, где сравнение заключается в наложении масс-спектрометрически детектированных хроматограмм по полному ионному току (MS-TIC) для образца сравнения и каждого из других анализируемых образцов, на основании чего рассчитывают соотношение интенсивностей для всех перекрывающихся и выровненных масс, при этом пики с соотношением более чем 10 оценивают как мутацию аминокислотной последовательности.

13. Способ по любому из пп.1-12, где сравнение дополнительно включает сравнение картины транслированных с ДНК пептидных протеолитических фрагментов теоретической аминокислотной последовательности и масс-спектрометрически детектированной хроматограммы по полному ионному току (MS-TIC) для анализируемого образца, и мутации аминокислотной последовательности идентифицируют путем добавления к каждой теоретически рассчитанной массе теоретической аминокислотной последовательности или путем вычитания из нее, соответственно, разности в массах, обусловленной мутацией нуклеиновой кислоты, делецией или вставкой в триплете оснований (кодоне), приводящей к изменению аминокислоты.

14. Способ получения полипептида, включающий следующую стадию:

- отбор клетки, продуцирующей полипептид, при этом указанный полипептид содержит наименьшее число мутаций в аминокислотной последовательности и соответственно наименьшее соотношение, определенные с использованием способа по любому из пп.1-13, относительно образца сравнения полипептида или предварительно определенной аминокислотной последовательности полипептида.

15. Способ получения иммуноглобулина, включающий стадии:

а) предоставления по меньшей мере двух клеток, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин,

б) раздельного хранения и культивирования клеток,

с) осуществления способа по любому из пп.1-13,

д) отбора клетки, продуцирующей иммуноглобулин, при этом иммуноглобулин содержит наименьшее число мутаций в аминокислотной последовательности относительно образца сравнения,

- е) культивирования данной клетки,
- ф) получения полипептида путем извлечения полипептида из клетки или среды культивирования.

RU 2012138298 A

RU 2012138298 A