

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391313** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.07.21**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.01.29**

(51) Int. Cl. **C07K 1/16** (2006.01)  
**A61K 47/64** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61K 31/191** (2006.01)

**(54) ГЛЮКУРОНИЛИРОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ НОВОЙ КИСЛОТНОЙ  
ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ  
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

(31) **62/624,338**

(32) **2018.01.31**

(33) **US**

(62) **202091577; 2019.01.29**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

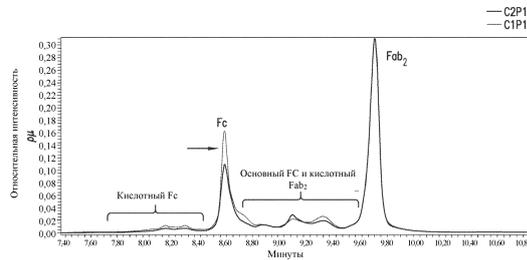
(72) Изобретатель:

**Ванг Шунхай (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Предусмотрены композиции и способы для выявления глюкурононированных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство.



**202391313**

**A1**

**A1**

**202391313**

**ГЛЮКУРОНИЛИРОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ НОВОЙ КИСЛОТНОЙ  
ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ  
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ НАСТОЯЩЕЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение в целом относится к системам и способам выявления посттрансляционных модификаций терапевтических белков.

ПРЕДПОСЫЛКИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В фармацевтической промышленности рекомбинантные моноклональные антитела (mAb) представляют собой основной класс белковых терапевтических средств. Изменения в структуре mAb могут влиять на терапевтическую эффективность, биодоступность и клиренс, а также иммуногенные свойства терапевтических mAb. Кроме того, изменения в mAb могут влиять на безопасность и эффективность лекарственного средства. Комплексная характеристика первичной структуры, посттрансляционных модификаций (PTM) и дисульфидных связей mAb имеет решающее значение для оценки эффективности и безопасности лекарственного средства, а также понимания взаимосвязи структура/функция.

Среди различных анализов, используемых для обеспечения согласованности продуктов и процессов, ионообменная хроматография (ИЕХ) представляет собой широко используемую методику для оценки гетерогенности молекул mAb по заряду. Варианты mAb, отличающиеся зарядом, часто можно объяснить посттрансляционными модификациями (PTM), которые могут изменять поверхностный заряд молекулы mAb. Благодаря постоянно совершенствующейся методике LC-MS было выявлено много известных или новых PTM. Кроме того, был изучен их вклад в неоднородность по заряду. Несмотря на то, что улучшения технологии обеспечили множество новых PTM, все еще существует необходимость в дальнейшем изучении характеристик и обнаружении PTM, которые изменяют активность и стабильность mAb.

Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение систем и способов для выявления PTM.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предусмотрены композиции и способы для выявления глюкуронизированных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления предусмотрен способ выявления глюкуронирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем дегликозилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и обработки дегликозилированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью фермента, например FabRICATOR®, с получением одного фрагмента Fc\* (два идентичных фрагмента Fc/2, связанных вместе с помощью нековалентных взаимодействий) и одного Fab<sub>2</sub>. Затем фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют на кислотные фракции Fc\* и Fab<sub>2</sub>. В одном варианте осуществления фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют с

применением ионообменной хроматографии, например хроматографии с сильной катионообменной средой. После разделения кислотные фракции собирают, высушивают и денатурируют. Высушенные и денатурированные кислотные фракции алкилируют и затем расщепляют с помощью трипсина с получением образца. Затем образец обрабатывают с помощью  $\text{NaBH}_4$  с получением восстановленного образца. Образцы как восстановленного  $\text{Fc}^*$ , так и восстановленного  $\text{Fab}_2$  затем подвергают анализу методом жидкостной хроматографии с обращенной фазой/масс-спектропии для выявления глюкуронылирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления способ включает стадию сравнения результатов масс-спектропии восстановленного образца и невосстановленного образца для выявления различий по массе восстановленного и невосстановленного образцов. Продукт, представляющий собой лекарственное средство, может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок. В одном варианте осуществления глюкуронылирование определяют на остатках лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

В одном варианте осуществления фрагменты  $\text{Fc}^*$  и  $\text{Fab}_2$  образуют с применением рекомбинантно модифицированной формы IdeS из *Streptococcus pyogenes*, продаваемой под названием FabRICATOR®.

Раскрытый способ можно применять для контроля чистоты продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, например моноклональных антител или других терапевтических белков. В одном варианте осуществления предусмотрен способ повышения чистоты продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем осуществления анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, для выявления глюкуронылирования первичной аминогруппы одной или более аминокислот продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и удаления глюкуронылированных белков из продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением очищенного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. Глюкуронылирование можно обнаружить с применением способов, описанных выше и в примерах. В одном варианте осуществления глюкуронылированные белки определяют с помощью методик высокоэффективной жидкостной хроматографии, необязательно в сочетании с масс-спектропией. Иллюстративные методики хроматографии включают без ограничения эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, сверхэффективную жидкостную хроматографию и их комбинации. Как правило, глюкуронылирование имеет место по остатку лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ выявления посттрансляционно модифицированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем проведения анализа продукта, представляющего собой

белковое лекарственное средство, полученного из культуры клеток млекопитающего, в отношении глюкуронилирования, при этом наличие глюкуронилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, указывает на то, что продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит посттрансляционные модификации. Культура клеток млекопитающего обычно содержит клетки яичника китайского хомячка.

В еще одном варианте осуществления предусмотрен продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий терапевтический белок, где глюкуронилированы менее 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 6,0%, 7,0%, 8,0%, 9,0% или 10% аминокислот терапевтического белка. В одном варианте осуществления аминокислота представляет собой лизин. Как правило, терапевтический белок представляет собой моноклональное антитело, рекомбинантный белок или слитый белок.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигуры 1A-1F представляют собой хроматограммы, на которых показаны результаты анализа вариантов Fab<sub>2</sub>, отличающихся зарядом, для иллюстративного mAb. Фигуры 1G-1P представляют собой хроматограммы, на которых показаны результаты анализа вариантов Fc, отличающихся зарядом, для иллюстративного mAb.

Фигура 2 представляет собой хроматограмму, на которой показано разделение кислотного Fc, основного Fc и кислотного Fab<sub>2</sub>.

На фигуре 3A показаны спектры фрагментации MS<sub>2</sub> для образцов без обработки с помощью NaBH<sub>4</sub>. На фигуре 3B показаны спектры фрагментации MS<sub>2</sub> для образцов, обработанных с помощью NaBH<sub>4</sub>.

Фигура 4A представляет собой хроматограмму, полученную с применением колонки WCX. Стрелка указывает на искусственную обработку глюкуроновой кислотой. Фигура 4B представляет собой график, на котором показаны результаты для контроля Fab<sub>2</sub>. Фигура 4C представляет собой график, на котором показаны результаты для Fab<sub>2</sub>, обработанного глюкуроновой кислотой. Фигура 4D представляет собой график, на котором показаны результаты для контроля Fc. Фигура 4E представляет собой график, на котором показаны результаты для Fc, обработанного глюкуроновой кислотой.

Фигура 5A представляет собой хроматограмму нативного образца, на которой показано существовавшее ранее глюкуронилирование. Фигура 5B представляет собой хроматограмму образца, обработанного глюкуроновой кислотой, на которой показано искусственное глюкуронилирование. На фигуре 5C показаны результаты спектров фрагментации M<sub>2</sub> для существовавшего ранее глюкуронилирования. На фигуре 5D показаны результаты спектров фрагментации M<sub>2</sub> для образцов, обработанных глюкуроновой кислотой.

Фигура 6A представляет собой хроматограмму второго образца. Фигура 6B представляет собой хроматограмму второго образца, обработанного глюкуроновой кислотой, на которой показано искусственное глюкуронилирование. На фигуре 6C показаны результаты спектров фрагментации M<sub>2</sub> для существовавшего ранее

глюкуронирования. На фигуре 6D показаны результаты спектров фрагментации M2 для образцов, обработанных глюкуроновой кислотой.

Фигура 7A представляет собой хроматограмму третьего образца. Фигура 7B представляет собой хроматограмму третьего образца, обработанного глюкуроновой кислотой, на которой показано искусственное глюкуронирование. На фигуре 7C показаны результаты спектров фрагментации M2 для существовавшего ранее глюкуронирования. На фигуре 7D показаны результаты спектров фрагментации M2 для образцов, обработанных глюкуроновой кислотой.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### I. Определения

Используемый в данном документе термин «антитело» предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена в «вариабельной области». Термин «вариабельная область» предназначен для того, чтобы отличать такой домен иммуноглобулина от доменов, которые в целом являются общими для антител (таких как Fc-домен антител). Вариабельная область включает «гипервариабельную область», остатки в которой отвечают за связывание с антигеном. Гипервариабельная область включает аминокислотные остатки из «области, определяющей комплементарность» или «CDR» (т. е. обычно остатки в положениях примерно 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и остатки в положениях примерно 27-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или те остатки из «гипервариабельной петли» (т. е. остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Остатки «каркасной области» или «FR» представляют собой такие остатки в вариабельном домене, которые отличаются от остатков в гипервариабельной области, определенных в данном документе.

Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело (mAb)» относится к антителу, которое получено с помощью идентичных иммунных клеток, которые являются клонами уникальной родительской клетки, которая специфически связывает целевое вещество. mAb становятся все более популярными в качестве терапевтических средств для лечения различных заболеваний, включая без ограничения виды рака, артрит, астму, колит, аутоиммунные заболевания и инфекции. mAb представляют собой крупные белки со значениями молекулярной массы примерно 150 кДа, и при этом они составлены из двух идентичных тяжелых цепей (HC) по ~50 кДа и двух идентичных легких цепей (LC) по ~25 кДа. Они также содержат по меньшей мере 16 дисульфидных связей, которые поддерживают трехмерную структуру и биологическую активность. Несмотря на то, что они имеют сходные вторичные белковые структуры, разные mAb сильно различаются по последовательности вариабельных областей,

особенно в областях, определяющих комплементарность (CDR), которые ответственны за разнообразие и специфичность связывания антитело-антиген.

Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одной или более частям антитела, которые содержат области антитела, определяющие комплементарность («CDR»), и необязательно остатки каркасной области, которые включают сайт распознавания антигена в «вариабельной области» антитела и проявляют способность иммуноспецифически связывать антиген. Такие фрагменты включают Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F<sub>v</sub>, одноцепочечный фрагмент (ScFv) и их мутантные формы, встречающиеся в природе варианты и слитые белки, содержащие сайт распознавания антигена в «вариабельной области» антитела и гетерологичный белок (например, токсин, сайт распознавания антигена для другого антигена, фермент, рецептор или лиганд рецептора и т. д.).

Используемый в данном документе термин «ионообменная хроматография (ИЕХ)» относится к способу разделения ионизируемых молекул на основе их общего заряда. Белки состоят как из положительно, так и отрицательно заряженных химических групп. В зависимости от значения рН окружающей среды белки могут нести суммарный положительный заряд, суммарный отрицательный заряд или не иметь заряда. Значение рН, при котором молекула не имеет заряда, называется изоэлектрической точкой (pI). Суммарный заряд белка, представляющего интерес, рассчитывается путем объединения изоэлектрической точки, которая может быть рассчитана на основе первичной последовательности молекулы, и значения рН буфера. Когда в колонку ИЕХ загружен образец с определенным рН, все белки, которые заряжены соответствующим образом, будут связываться с ионообменной смолой в колонке. Например, белок с суммарным отрицательным зарядом будет улавливаться колонкой с анионообменной смолой.

Используемый в данном документе термин «варианты, отличающиеся зарядом» относится к изоформам и вариантам белка с измененной изоэлектрической точкой (pI) или зарядом по сравнению с немодифицированной формой. Варианты, отличающиеся зарядом, с относительно более низкой pI называются «кислотными вариантами», в то время как варианты, отличающиеся зарядом, с относительно более высокой pI называются «основными вариантами». Варианты, отличающиеся зарядом, могут влиять на свойства антител, включая изменение способности mAb связывать белки или мишени на клеточной оболочке. Это может повлиять на проникновение в ткани, распределение в тканях и фармакокинетику антител. Примеры вариантов, отличающихся зарядом, включают без ограничения продукты дезамидирования, образования N-концевого пироглутамата, агрегации, изомеризации, сиаилирования гликанов, фрагментации антител и гликирования в остатках лизина.

Используемый в данном документе термин «посттрансляционная модификация (PTM)» относится к биохимическим модификациям, которые происходят с одной или более аминокислотами в белке после биосинтеза белка. PTM играет важную роль в клеточной функции посредством регуляции фолдинга белков, нацеливания белков на

специфические клеточные компартменты или посредством регуляции взаимодействия между лигандами и другими белками. Наиболее распространенные модификации представляют собой специфическое расщепление белков-предшественников; образование дисульфидных связей; или ковалентное добавление или удаление низкомолекулярных групп, что приводит к таким модификациям, как ацетилирование, амидирование, биотинилирование, цистеинилирование, деамидирование, фарнезилирование, формилирование, геранилирование, глутатионилирование, гликирование (конъюгация с углеводами без участия ферментов), гликозилирование (ферментативная конъюгация с углеводами), гидроксилирование, метилирование, моно-ADP-рибозилирование, миристоилирование, окисление, пальмитоилирование, фосфорилирование, поли-ADP-рибозилирование, стеароилирование или сульфатирование. Убиквитинилирование является еще одной распространенной РТМ, которая важна в путях разложения белков. Некоторые РТМ обратимы под действием деконъюгирующих ферментов.

Используемый в данном документе термин «N-связанное гликозилирование» относится к посттрансляционной модификации белка. N-связанное гликозилирование представляет собой присоединение олигосахаридов к атому азота, обычно к N4 остатков аспарагина. Все N-связанные углеводы связаны через N-ацетилглюкозамин и аминокислоту аспарагин.

Используемый в данном документе термин «пептидное картирование» относится к методике определения характеристик белков и изучения их первичных аминокислотных структур. Это широко применяемая методика для определения характеристик моноклональных антител и других фармацевтических препаратов на основе рекомбинантных белков.

Используемый в данном документе термин «глюкуронидирование» относится к реакции конъюгации, где глюкуроновая кислота, полученная из кофактора UDP-глюкуроновой кислоты, ковалентно связывается с субстратом, содержащим нуклеофильную функциональную группу.

## **II. Способы выявления глюкуронилирования и способы его применения**

### **A. Идентификация глюкуронилирования**

Предусмотрены композиции и способы для выявления глюкуронилированных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство. В примерах 1-3 представлено подробное описание способов, которые применяют для обнаружения и выявления глюкуронилированных аминокислот в терапевтических белках. Как правило, один способ выявления глюкуронилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, включает дегликозилирование продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и обработку дегликозилированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью FabRICATOR® с получением одного фрагмента Fc\* (два идентичных фрагмента Fc/2, связанных вместе с помощью нековалентных взаимодействий) и одного фрагмента Fab<sub>2</sub>. В одном варианте осуществления фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> получают с применением рекомбинантного

фермента IdeS из *Streptococcus pyogenes*, продаваемого под названием FabRICATOR®.

Затем фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют на кислотные фракции Fc\* и Fab<sub>2</sub>. В одном варианте осуществления фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют с применением ионообменной хроматографии, например хроматографии с сильной катионообменной средой. Как описано в примере 1, аликвоту дегликозилированного образца mAb (~ 50 мкг) вводили в сильную катионообменную колонку (SCX) YMC-BioPro SP-F (100 × 4,6 мм), соединенную с масс-спектрометром Thermo Exactive Plus EMR или масс-спектрометром Thermo Q Exactive plus для измерения массы. Образцы разделяли и элюировали в течение 20 минут с градиентом pH с помощью буферов на основе ацетата аммония (буфер А: 20 mM ацетата аммония, значение pH 5,8; буфер В: 200 mM ацетата аммония, значение pH 7,6). После колонки SCX был подключен аналитический делитель потока (отношение ~ 200:1) для уменьшения скорости аналитического потока до ~ 2 мкл/мин. перед применением масс-спектрометра для определения массы. Интенсивный поток из делителя был отведен на детектор с фотодиодной матрицей (PDA) Waters ACQUITY для одновременного УФ-детектирования (280 нм). В результате был обнаружен пик плеча кислотной кривой, который был приписан варианту антитела с увеличением массы на приблизительно 176 Да.

После разделения кислотные фракции собирают, высушивают и денатурируют. В одном варианте осуществления собранные кислотные фракции сначала высушивают в SpeedVac™, а затем денатурируют и восстанавливают в 20 мкл раствора, содержащего 5 mM дитиотреитола (DTT), 8 M мочевины и 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), посредством нагревания при 50°C течение 30 минут. Следует понимать, что специалисту в данной области техники будет понятно, что для высушивания и денатурирования кислотных фракций можно применять другие восстанавливающие средства, денатурирующие средства и значения температуры.

Высушенные и денатурированные кислотные фракции алкилируют и затем ферментативно расщепляют, например с помощью трипсина, с получением образца. Кислотные фракции можно алкилировать посредством инкубирования их в 10 mM йодацетамиде (IAA) при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Расщепление фракций может быть достигнуто путем разбавления их с помощью 175 мкл 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) и добавления трипсина при соотношении фермента к субстрату 1:10 (вес/вес) при 37°C в течение 4 часов.

Затем расщепленную трипсином кислотную фракцию инкубируют с 50 mM NaBH<sub>4</sub> при 37°C в течение 1 часа перед гашением 10% муравьиной кислотой (FA) с получением восстановленного образца. Восстановленный образец затем подвергают анализу методом жидкостной хроматографии с обращенной фазой/масс-спектропии для выявления глюкуронылирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления способ включает стадию сравнения результатов масс-спектропии восстановленного образца и невосстановленного образца для выявления различий по массе восстановленного и невосстановленного образцов.

Продукт, представляющий собой лекарственное средство, может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок. В одном варианте осуществления гликозилирование определяют на остатках лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

#### **В. Способы повышения чистоты продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство.**

Раскрытые способы можно применять для контроля чистоты продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, например моноклональных антител или других терапевтических белков. В одном варианте осуществления предусмотрен способ повышения чистоты продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем осуществления анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, для выявления гликозилирования первичной аминогруппы одной или более аминокислот продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и удаления гликозилированных белков из продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением очищенного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. Гликозилирование можно обнаружить с применением способов, описанных выше и в примерах. В одном варианте осуществления гликозилированные белки удаляют с помощью методик высокоэффективной жидкостной хроматографии, необязательно в сочетании с масс-спектрометрией. Иллюстративные методики хроматографии включают без ограничения эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, сверхэффективную жидкостную хроматографию и их комбинации. Как правило, гликозилирование имеет место по остатку лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ выявления посттрансляционно модифицированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем проведения анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, полученного из культуры клеток млекопитающего, в отношении гликозилирования, при этом наличие гликозилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, указывает на то, что продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит посттрансляционные модификации. Культура клеток млекопитающего обычно содержит клетки яичника китайского хомячка.

#### **С. Продукты, представляющие собой белковое лекарственное средство**

В еще одном варианте осуществления предусмотрен продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий терапевтический белок, где гликозилированы менее 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 6,0%, 7,0%, 8,0%, 9,0% или 10% аминокислот терапевтического белка. Процент гликозилирования можно определить с применением раскрытых способов. В одном варианте осуществления аминокислота

представляет собой лизин. Как правило, терапевтический белок представляет собой моноклональное антитело или слитый белок.

Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, рекомбинантный белок или слитый белок. Антитело предпочтительно представляет собой моноклональное антитело.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Идентификация модификаций на интактном уровне антител**

#### Способы

mAb подвергали анализу IEX-MS, происходящему в реальном времени. Аликвоту дегликозилированного образца mAb (~ 50 мкг) вводили в сильную катионообменную колонку (SCX) YMC-BioPro SP-F (100 × 4,6 мм), соединенную с масс-спектрометром Thermo Exactive Plus EMR или масс-спектрометром Thermo Q Exactive plus для измерения массы. Образцы разделяли и элюировали в течение 20 минут с градиентом pH с помощью буферов на основе ацетата аммония (буфер А: 20 mM ацетата аммония, значение pH 5,8; буфер В: 200 mM ацетата аммония, значение pH 7,6). После колонки SCX был подключен аналитический делитель потока (отношение ~ 200:1) для уменьшения скорости аналитического потока до ~ 2 мкл/мин. перед применением масс-спектрометра для определения массы. Интенсивный поток из делителя был отведен на детектор с фотодиодной матрицей (PDA) Waters ACQUITY для одновременного УФ-детектирования (280 нм).

#### Результаты

В результате был обнаружен пик плеча кислотной кривой, который был приписан варианту антитела с увеличением массы на приблизительно 176 Да. Однако измерение массы на интактном уровне не было точным из-за осложнений, обусловленных продуктами модификации путем гликирования, которые элюируются в том же пике плеча кислотной кривой и являются близкими по массе (162 Да).

### **Пример 2. Обнаружение новой кислотной модификации на субдоменном уровне антител**

#### Способы

Чтобы увеличить разрешение кислотного пика до главного пика и повысить точность измерения массы, образец дегликозилированного mAb обрабатывали с помощью FabRICATOR, фермента, который расщепляет тяжелую цепь на С-конце двух дисульфидных связей в шарнирной области.

#### Результаты

Эта обработка привела к получению одного фрагмента Fab<sub>2</sub> и двух идентичных фрагментов Fc/2, которые связаны друг с другом посредством нековалентных связей (Fc\*). Аликвоту продукта расщепления подвергали анализу IEX-MS, происходящему в реальном времени, как описано выше. Как и ожидалось, одинаковый кислотный вариант с увеличением массы на ~176 Да обнаружили в кислотных пиках как Fab<sub>2</sub>, так и Fc\* (фиг.

1A-1P).

### **Пример 3. Идентификация и подтверждение новой кислотной модификации**

#### Способы

Чтобы дополнительно идентифицировать сайты модификации аминокислотных остатков и получить точную массу этой неизвестной модификации, кислотные фракции фрагментов Fc\* и Fab2 собирали из колонки SCX для анализа методом пептидного картирования. Собранные кислотные фракции сначала высушивали в SpeedVac, а затем денатурировали и восстанавливали в 20 мкл раствора, содержащего 5 mM дитиотреитола (DTT), 8 M мочевины и 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), посредством нагревания при 50°C течение 30 минут. Образцы затем алкилировали с помощью 10 mM йодацетамида (IAA) посредством инкубирования при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Восстановленные и алкилированные образцы затем разбавляли с помощью 175 мкл 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) и расщепляли с помощью трипсина при соотношении фермента к субстрату 1:10 (вес/вес) при 37°C в течение 4 часов. Расщепление останавливали путем добавления 4 мкл 10% FA. Аликвоты каждого образца расщепленного белка затем разделяли с помощью RP-UPLC с последующим анализом MS, происходящим в реальном времени. Эксперименты MS и MS/MS проводили на системе Thermo Q Exactive Plus MS с высокоэнергетичной столкновительной диссоциацией (HCD), применяемой для фрагментации пептидов во время экспериментов MS/MS. Затем в файлах исходных данных MS проводился поиск по базе данных, содержащей последовательность mAb и переменную безразличную модификацию массой от 170 до 180 Да.

#### Результаты

Результаты показали, что эта неизвестная модификация характеризовалась моноизотопной массой +176,03 Да и имела место при низких уровнях нескольких остатков Lys в последовательности mAb (фигура 2). Основываясь на точной дельта-массе, эта модификация предположительно имела тот же элементный состав ( $C_6H_8O_6$ ), что и продукт глюкуронидирования, которое, однако, как сообщалось, происходит на остатках Ser и Thr посредством O-связи, катализируемой UDP-глюкуронозилтрансферазой.

Расщепленную трипсином кислотную фракцию инкубировали с 50 mM NaBH<sub>4</sub> при 37°C в течение 1 часа перед гашением 10% муравьиной кислотой (FA). Образец, обработанный с помощью NaBH<sub>4</sub>, затем подвергали анализу методом RP LC/MS. Результат показал, что эта модификация (+176 Да) может быть восстановлена (+178 Да) с помощью NaBH<sub>4</sub>, что указывает на присутствие структуры основания Шиффа в данной модификации (фигуры 3A-3B).

Искусственное глюкуронилирование осуществляли посредством инкубирования образца mAb со 100 mM глюкуроновой кислоты при 37°C в течение 24 часов.

Последующее расщепление трипсином и анализ методом пептидного картирования показали, что ряд глюкуронилированных пептидов, присутствующих в гораздо большем количестве в образцах с искусственной модификацией, демонстрирует такие же точные массы, спектры фрагментации MS<sup>2</sup> и значения времени удерживания, как и такие в

необработанном образце (фигуры 4A-4E, 5A-5D, 6A-6D и 7A-7D).

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий терапевтический белок, где глюкуронированы менее 10% аминокислот терапевтического белка.

2. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по п. 1, где глюкуронированы менее 5% аминокислот терапевтического белка.

3. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по п. 1 или п. 2, где аминокислоты представляют собой аминокислоту лизин.

4. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по любому из пп. 1-3, где терапевтический белок представляет собой антитело или слитый белок.

5. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по п. 4, где антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

6. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий терапевтический белок, где глюкуронированы менее 3% аминокислот, представляющих собой лизин, терапевтического белка.

7. Способ повышения чистоты продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, включающий

осуществление анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, для выявления глюкуронирования первичной аминогруппы одной или более аминокислот продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство; и

удаление глюкуронированных белков из продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением очищенного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

8. Способ по п. 7, где глюкуронированные белки удаляют посредством методик высокоэффективной жидкостной хроматографии.

9. Способ по п. 8, где методики хроматографии выбраны из группы, состоящей из эксклюзионной хроматографии, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии и их комбинаций.

10. Способ по п. 9, где методику хроматографии применяют в сочетании с анализом методом масс-спектропии.

11. Способ по любому из пп. 7-10, где аминокислоты представляют собой аминокислоту лизин.

12. Способ по любому из пп. 7-11, где терапевтический белок представляет собой антитело или слитый белок.

13. Способ по п. 12, где антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

14. Способ выявления посттрансляционно модифицированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, включающий проведение анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное

средство, полученного из культуры клеток млекопитающего, в отношении глюкуронилирования, при этом наличие глюкуронилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, указывает на то, что продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит посттрансляционные модификации.

15. Способ по п. 14, где культура клеток млекопитающего содержит клетки яичника китайского хомячка.

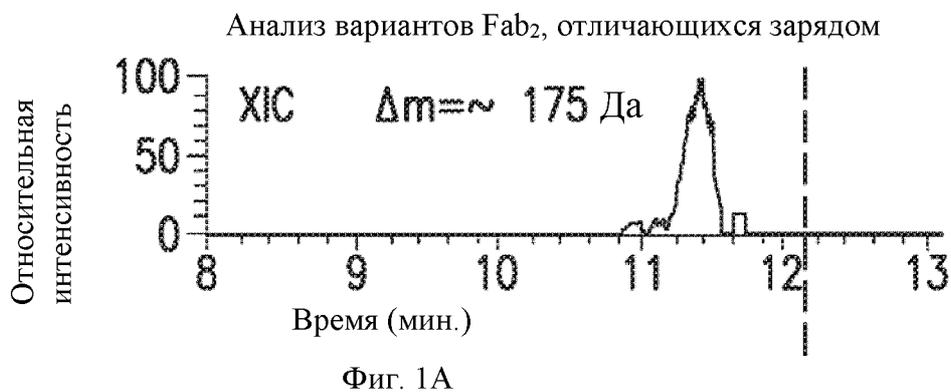
16. Способ по п. 14 или п. 15, где глюкуронилирование имеет место по аминокислотам, представляющим собой лизин, продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

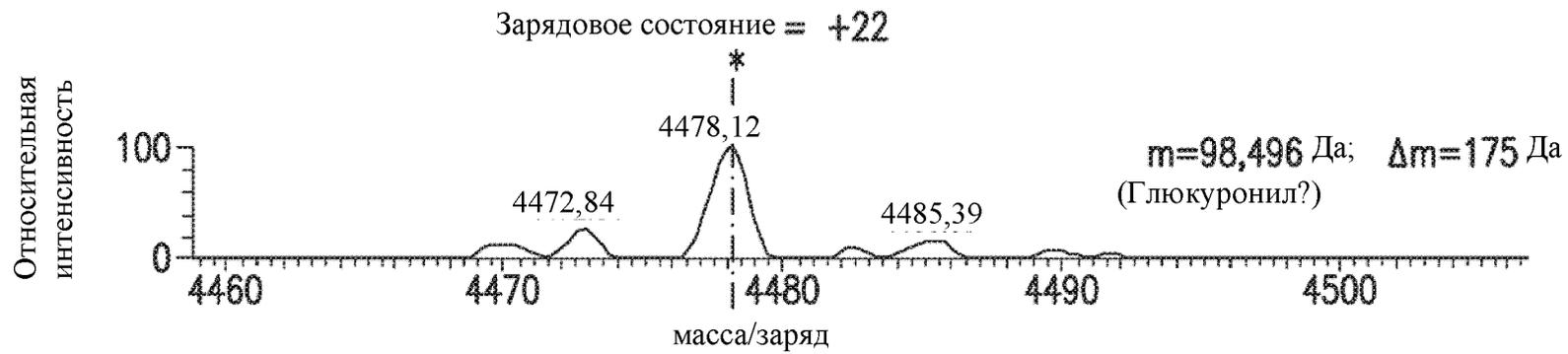
17. Способ по любому из пп. 14-16, где продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, представляет собой антитело или слитый белок.

18. Способ по любому из пп. 17, где антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

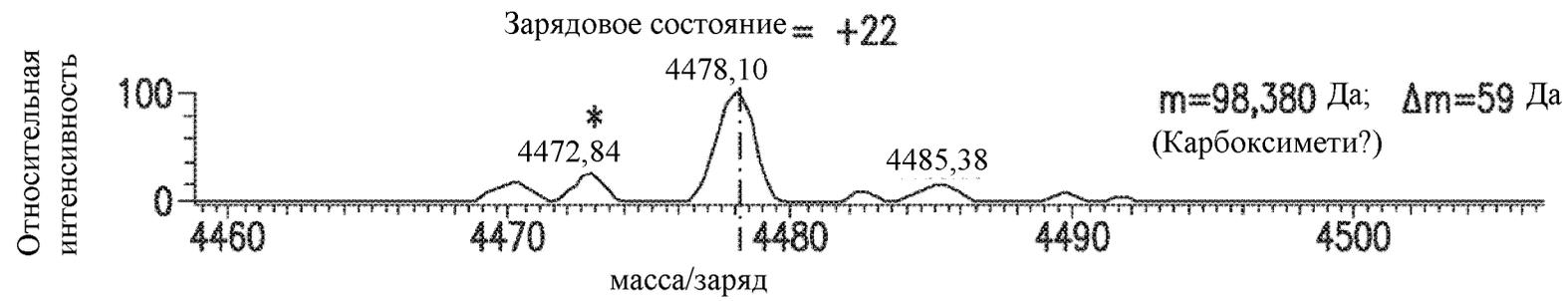
По доверенности

1/17





Фиг. 1D



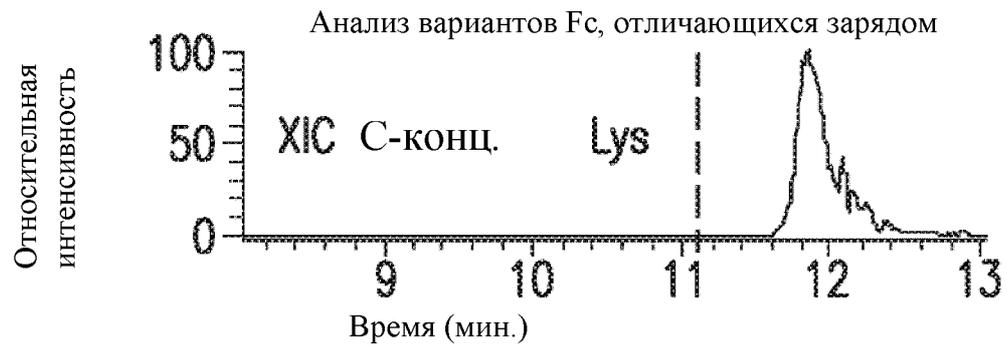
Фиг. 1E



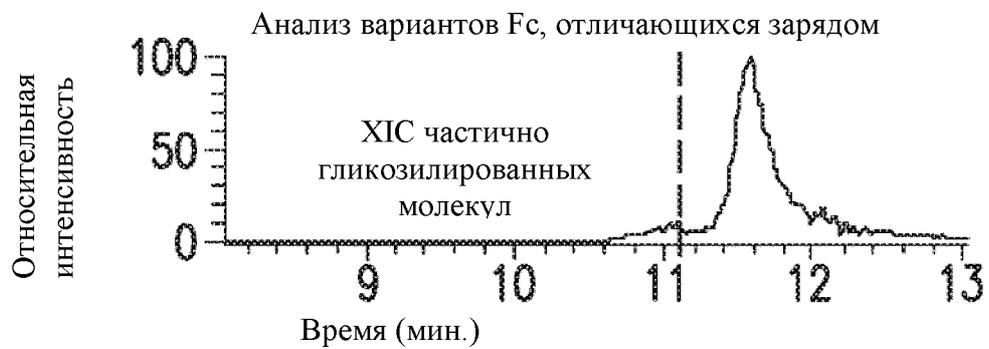
Фиг. 1F



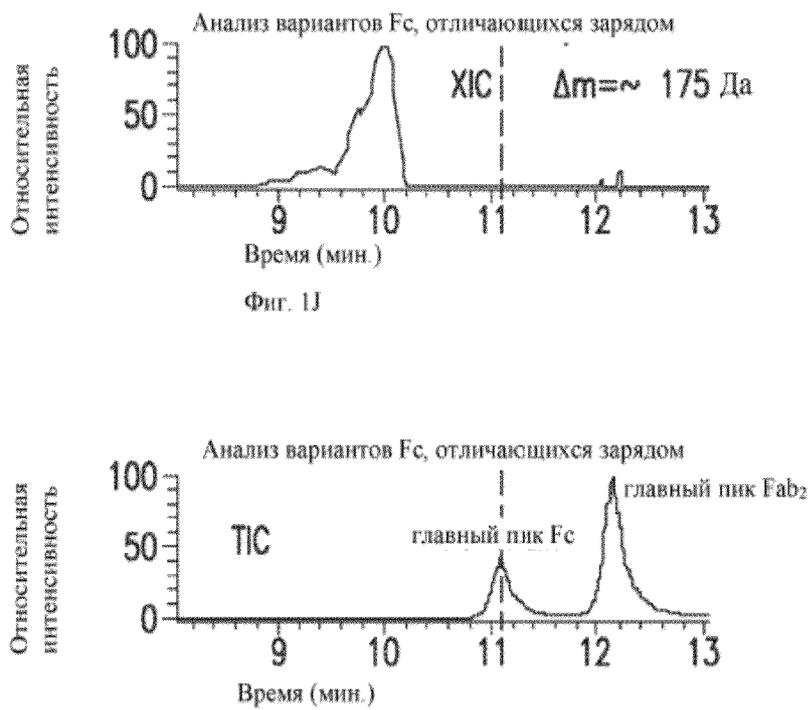
Фиг. 1G



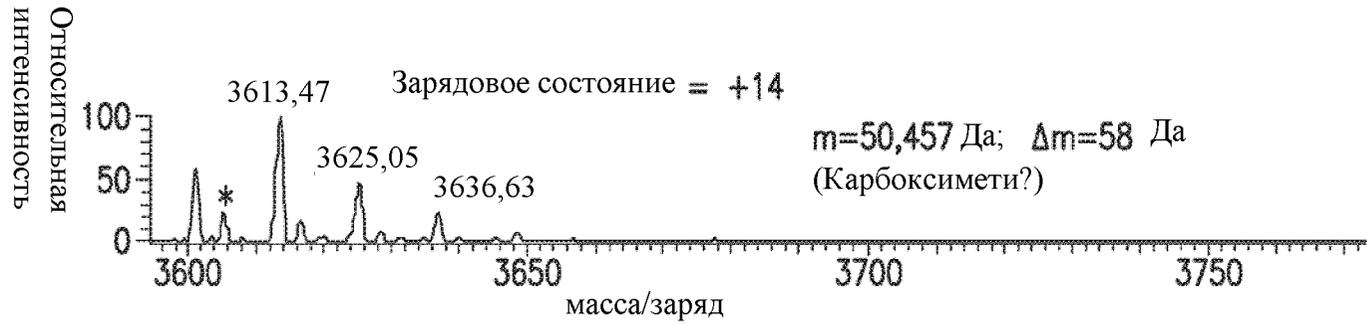
Фиг. 1H



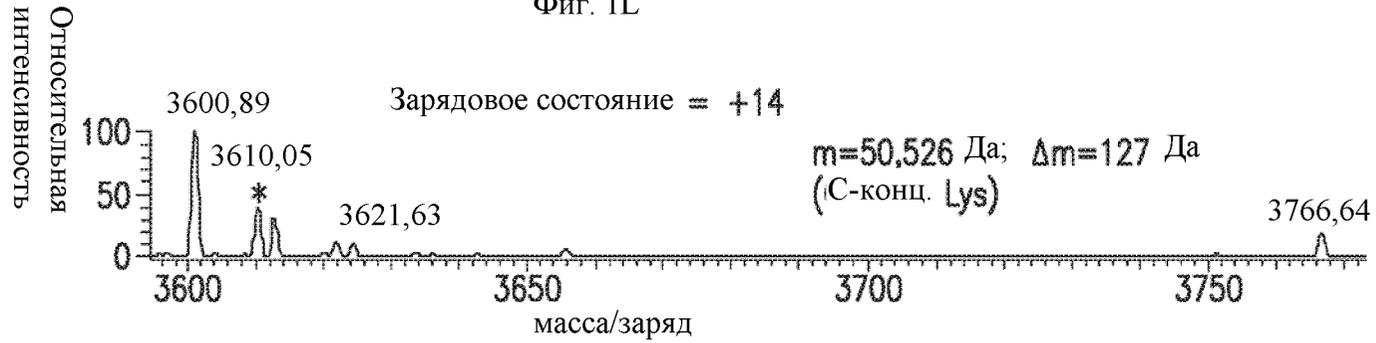
Фиг. 1I



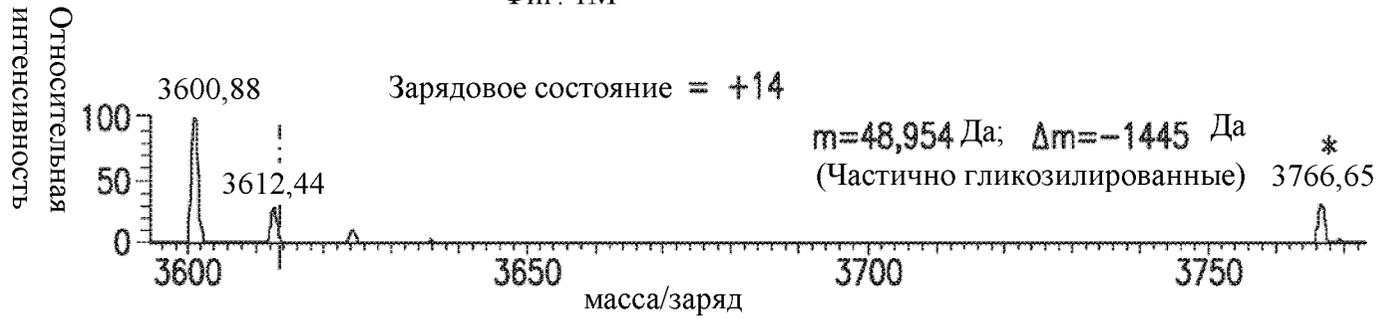
Фиг. 1К



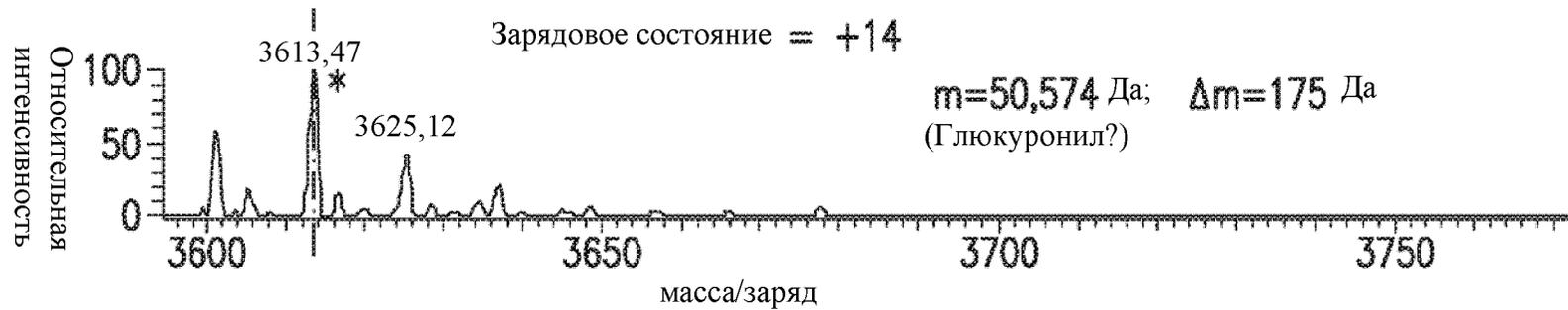
Фиг. 1L



Фиг. 1M



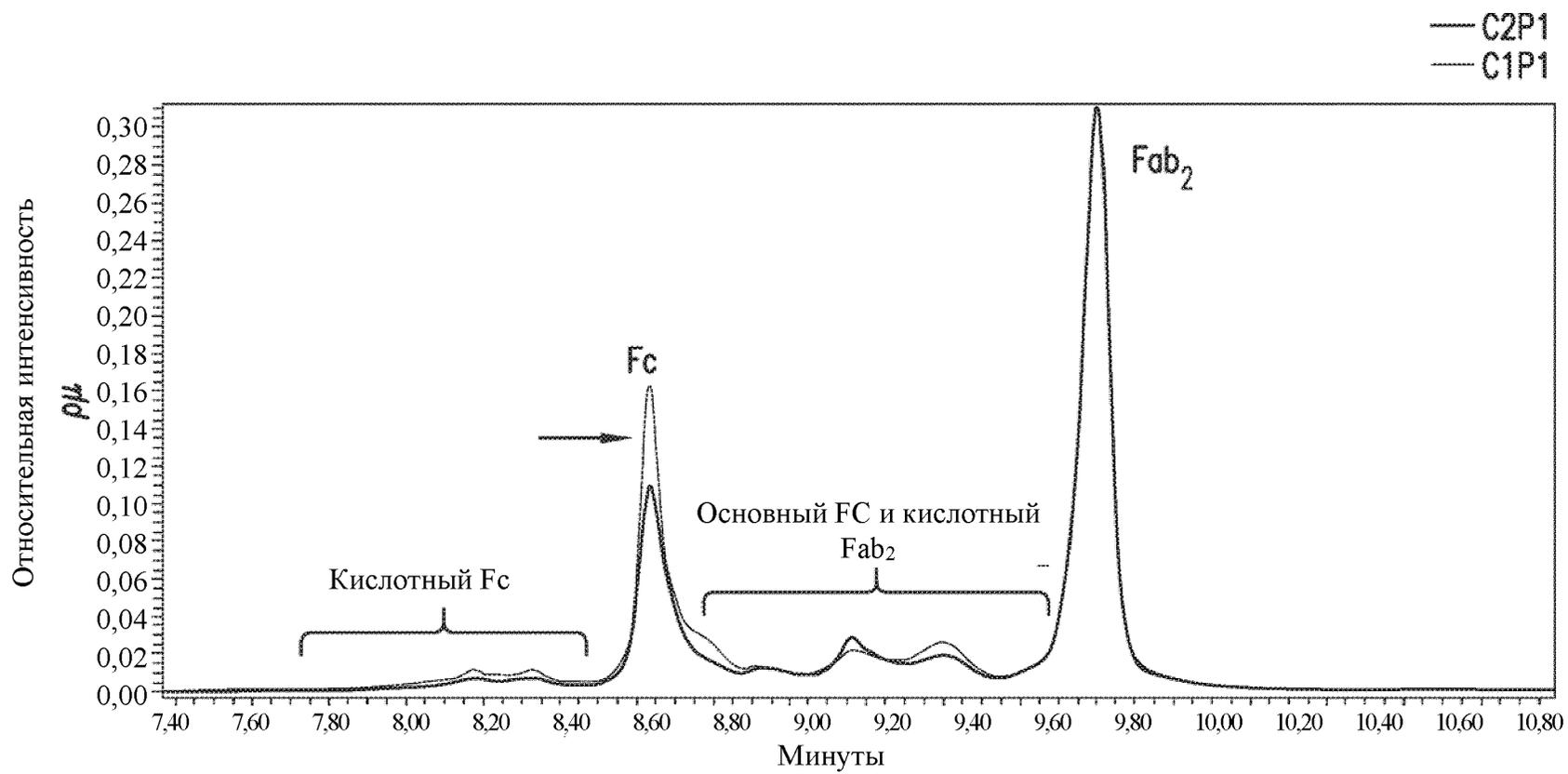
Фиг. 1N



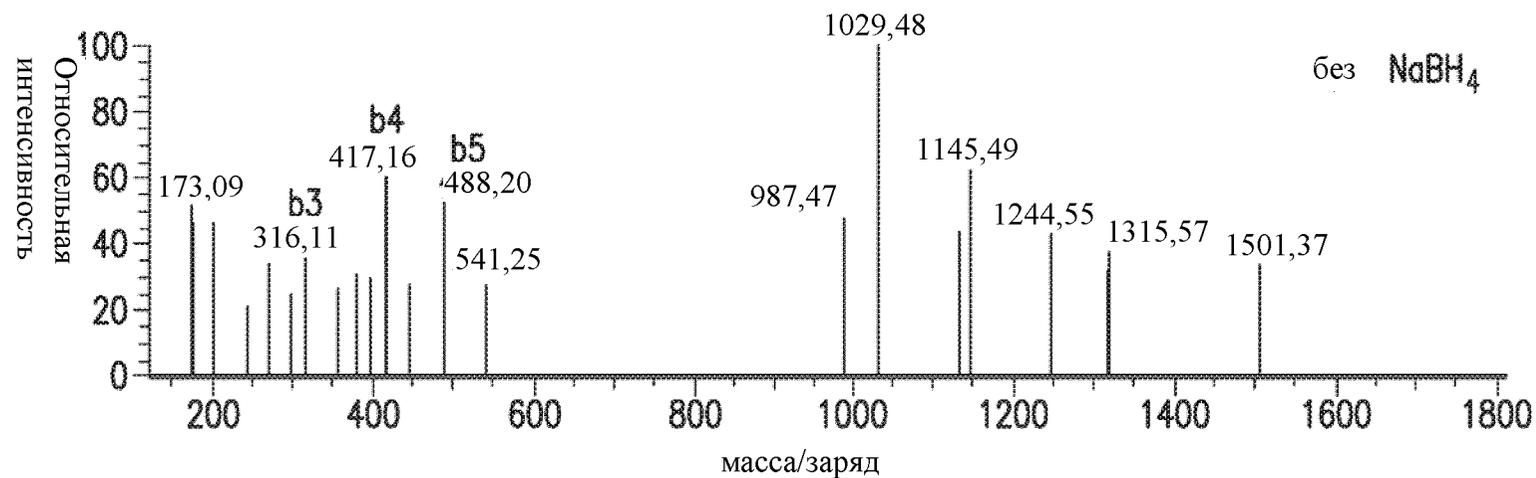
Фиг. 10



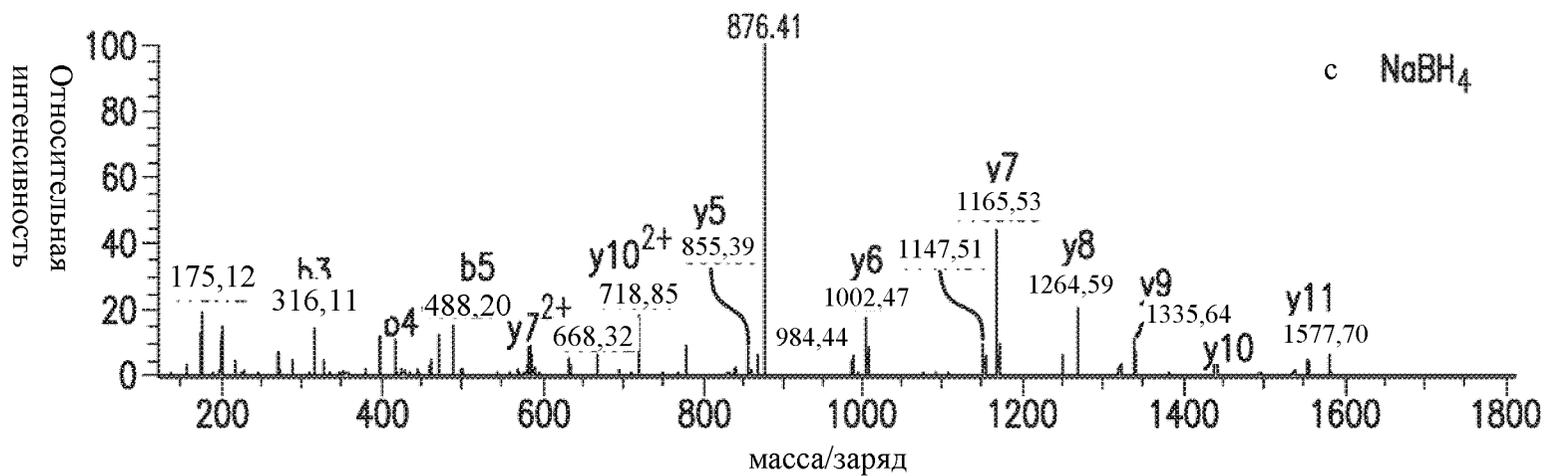
Фиг. 1P



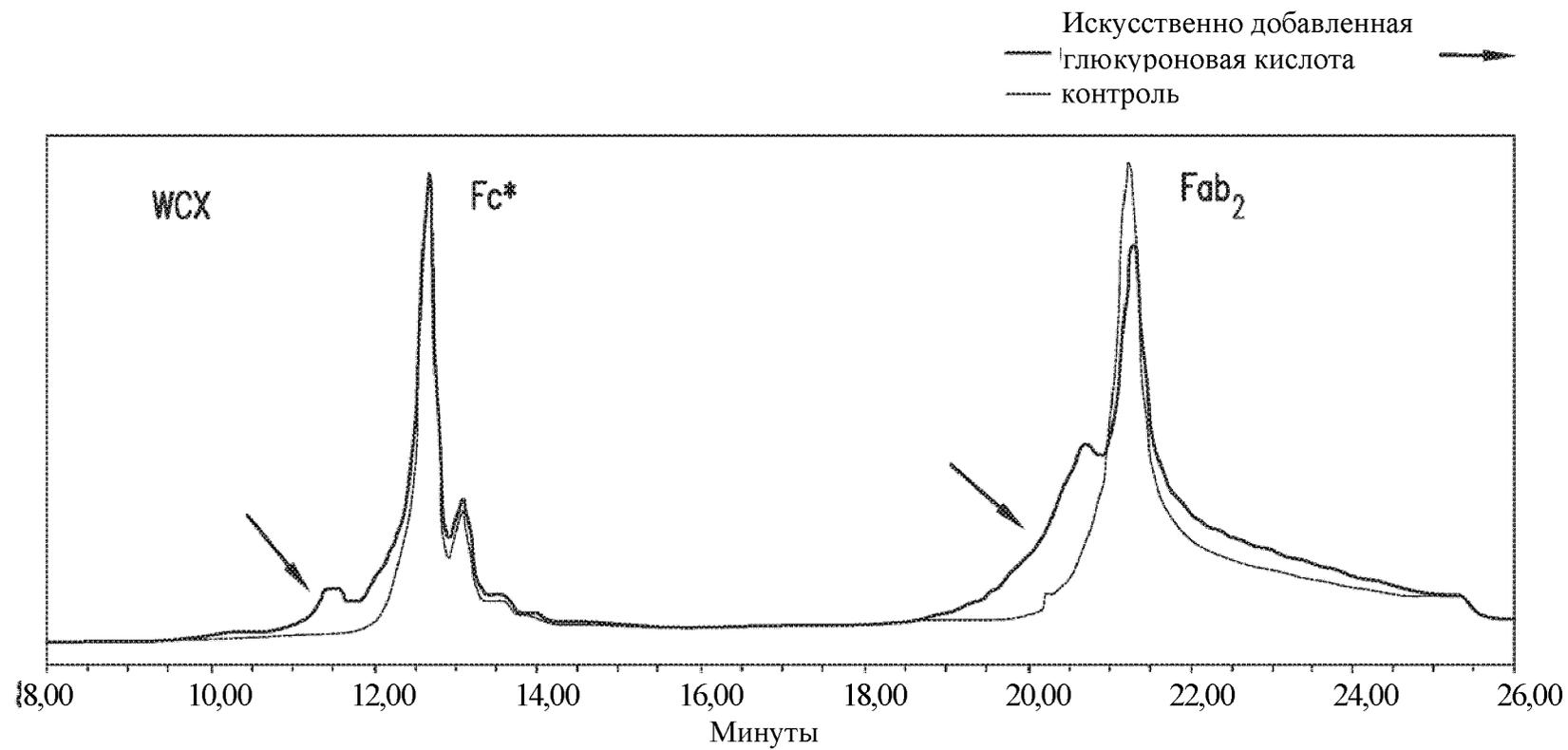
Фиг. 2



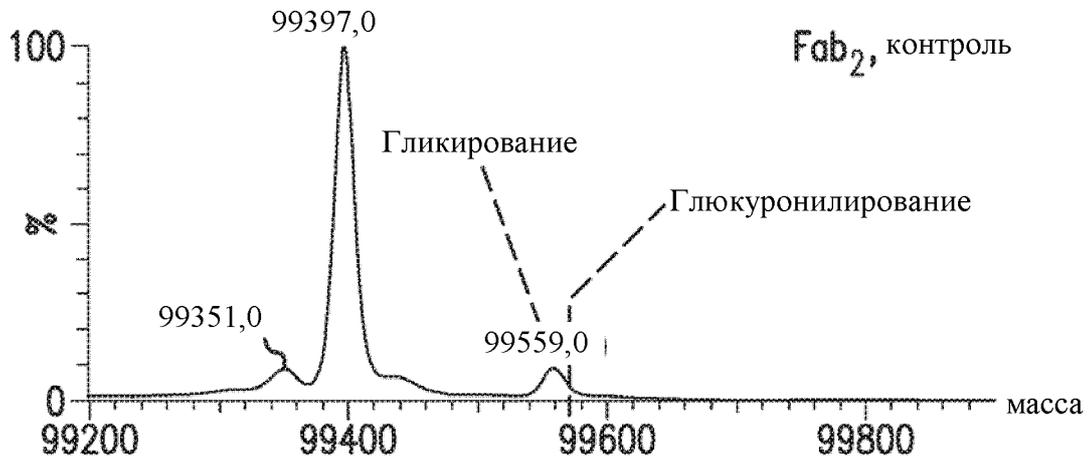
Фиг. 3А



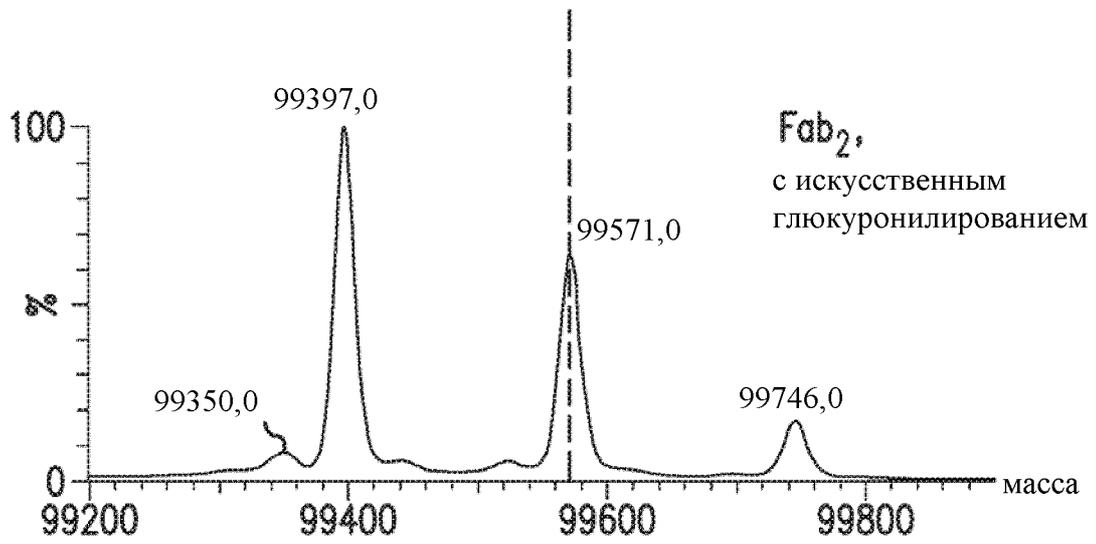
Фиг. 3В



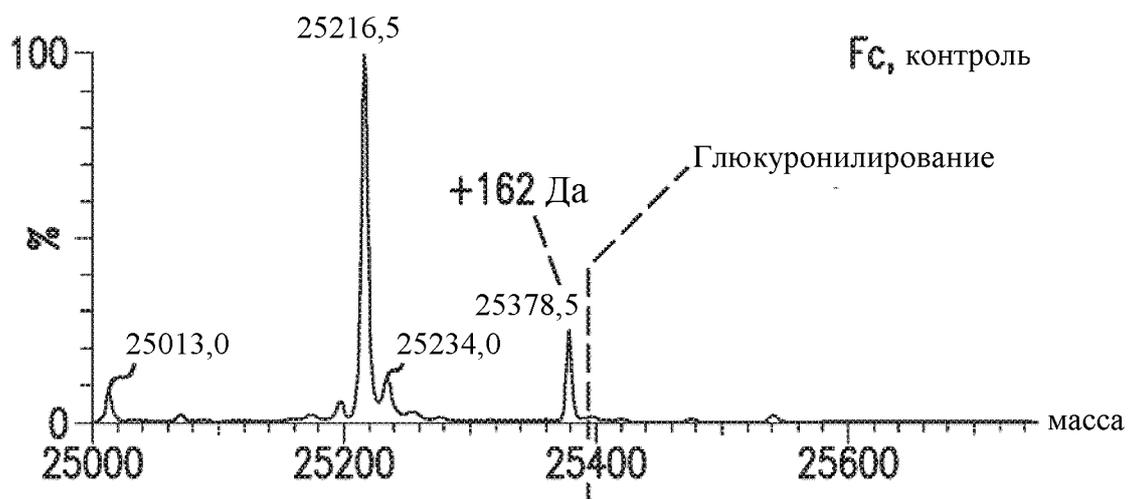
Фиг. 4А



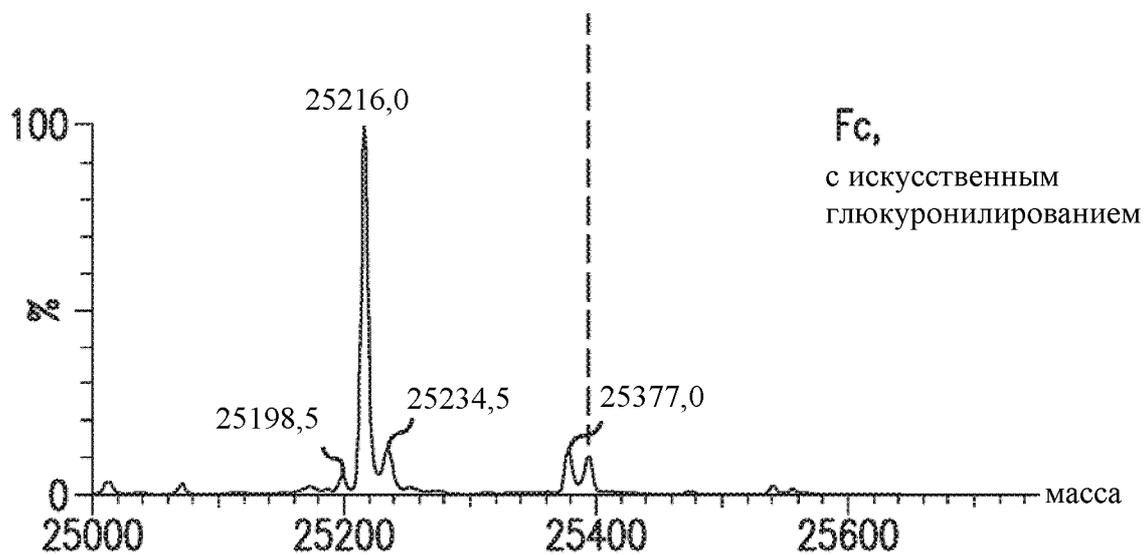
Фиг. 4В



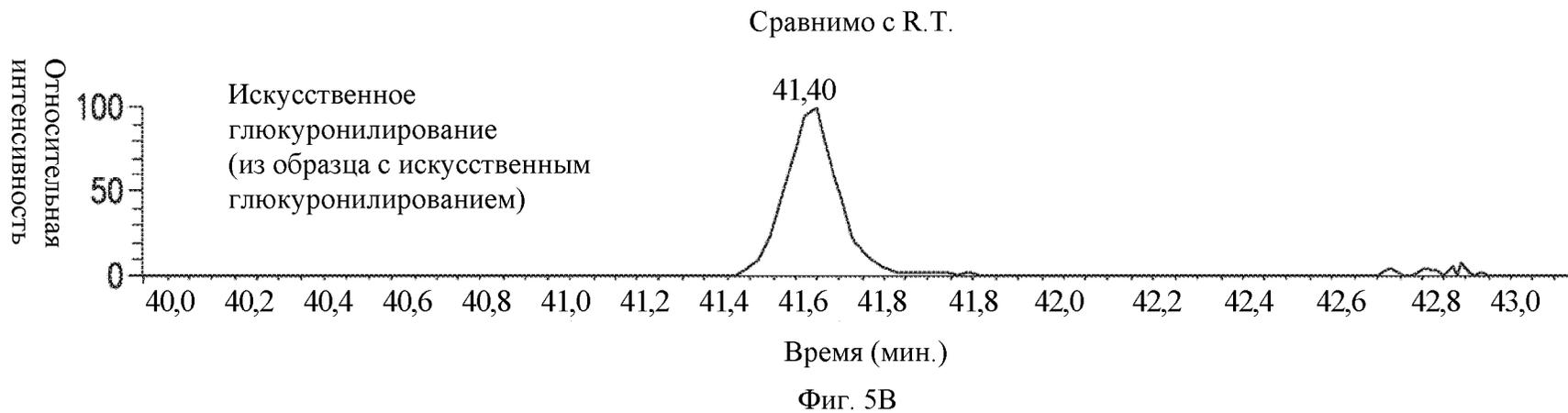
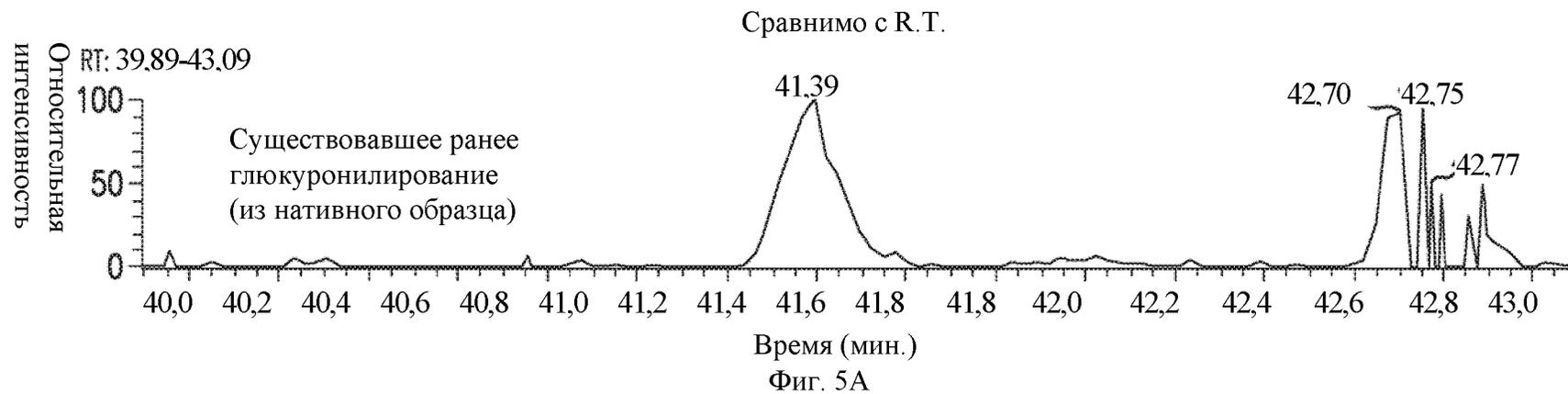
Фиг. 4С



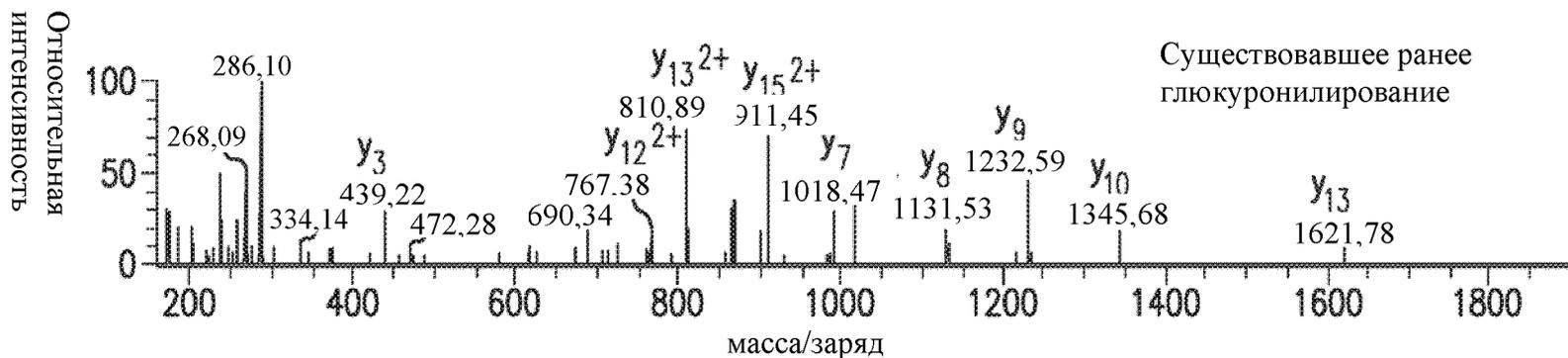
Фиг. 4D



Фиг. 4E

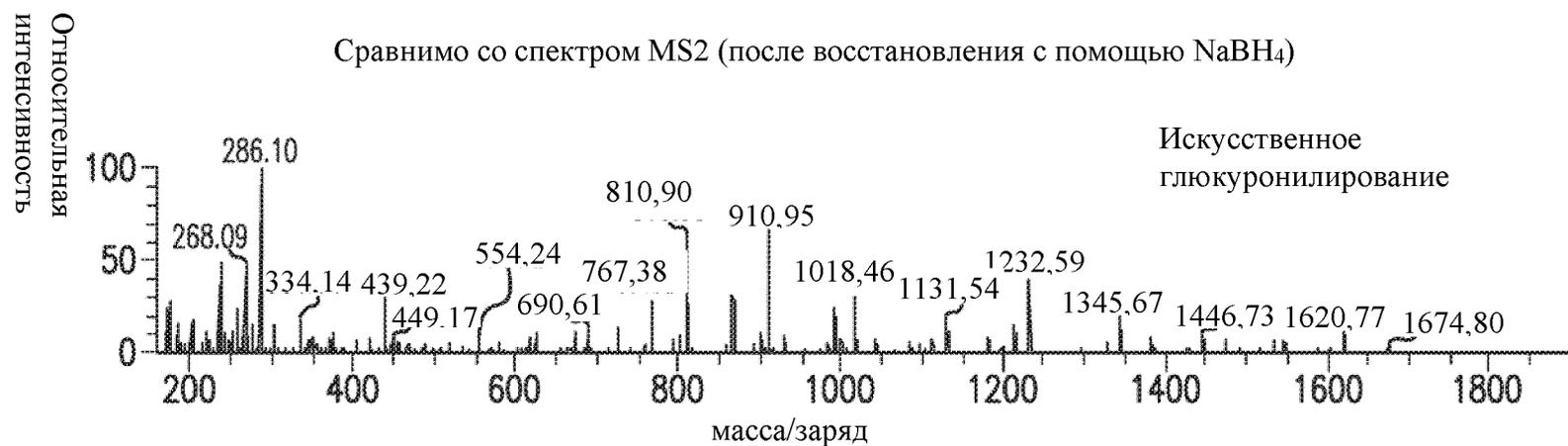


Сравним со спектром MS2 (после восстановления с помощью NaBH<sub>4</sub>)

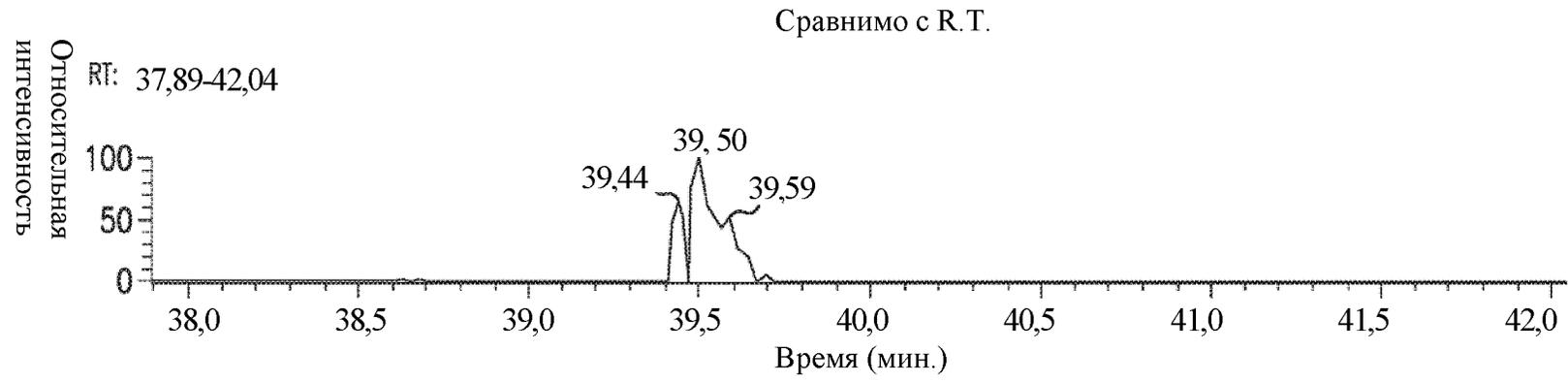


Фиг. 5С

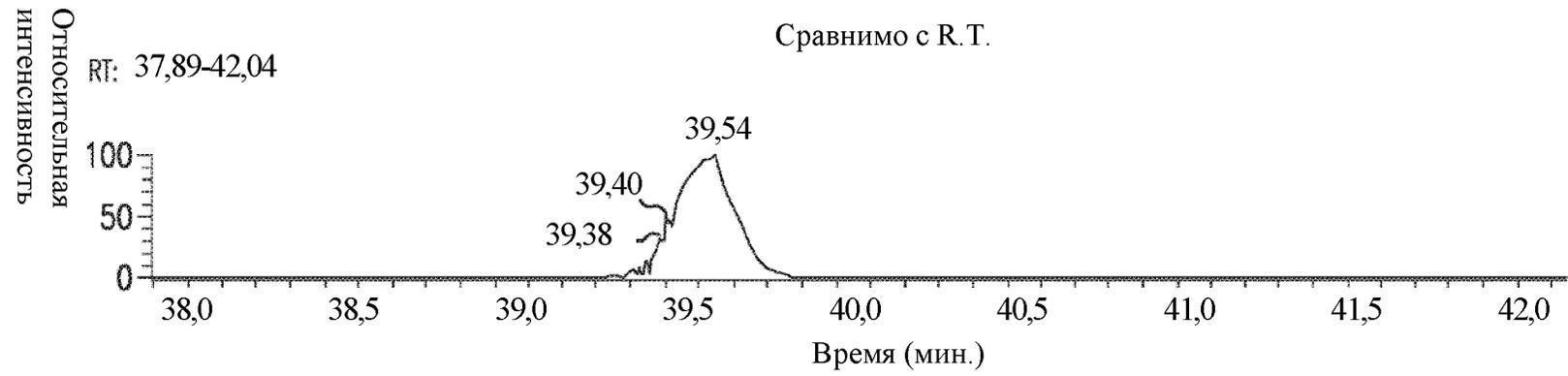
Сравним со спектром MS2 (после восстановления с помощью NaBH<sub>4</sub>)



Фиг. 5D

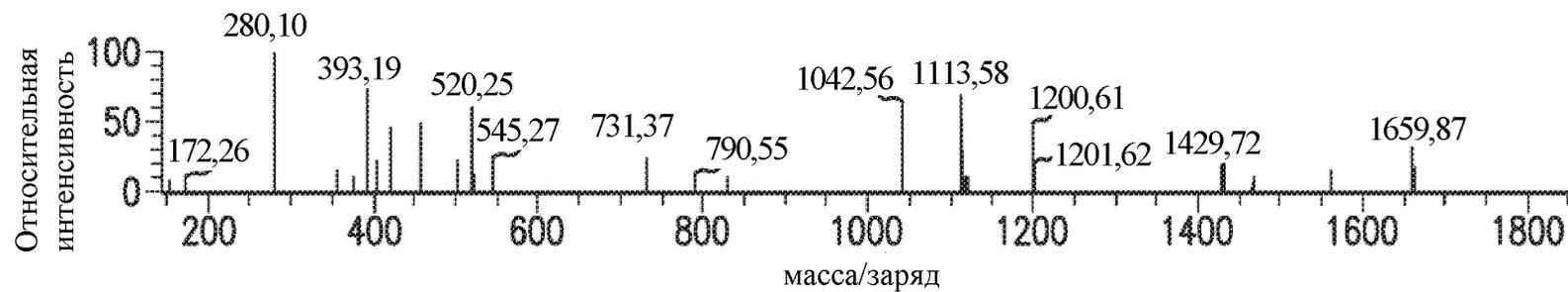


Фиг. 6А



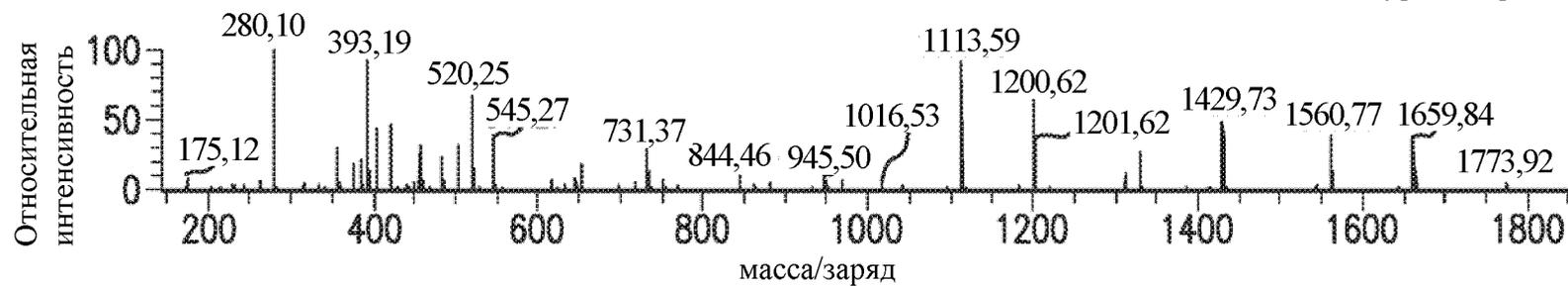
Фиг. 6В

Сравнимо со спектром MS2 (после восстановления с помощью NaBH<sub>4</sub>)



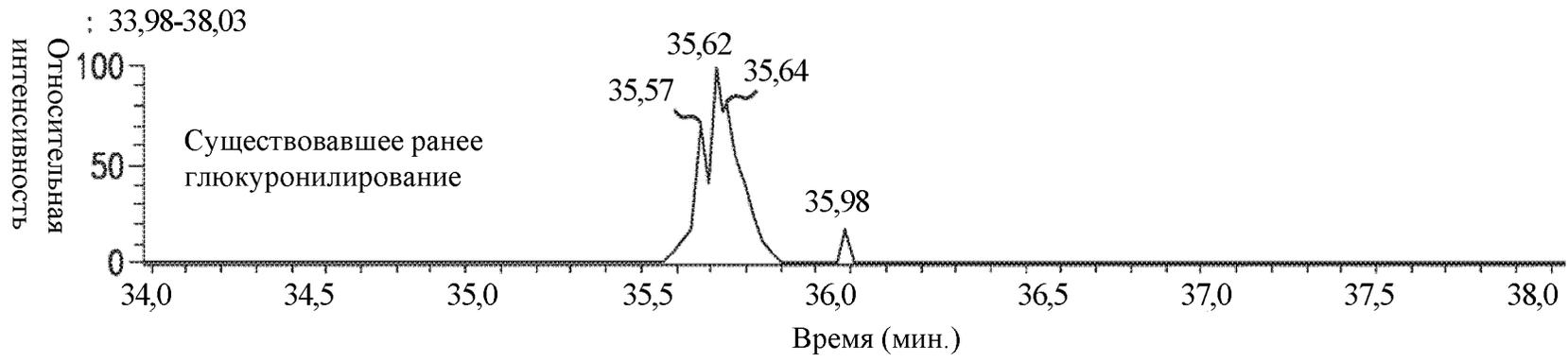
Фиг. 6С

Сравнимо со спектром MS2 (после восстановления с помощью NaBH<sub>4</sub>)

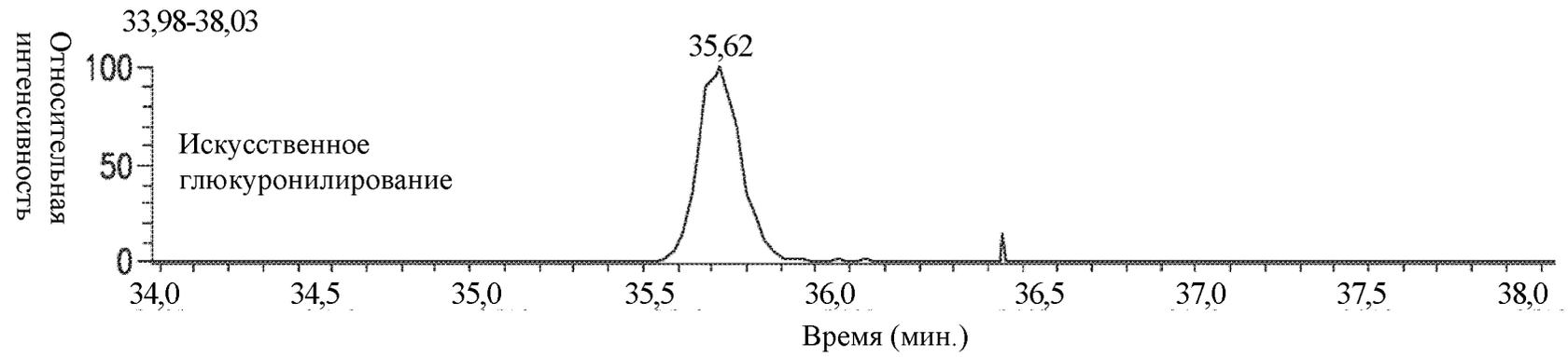


Фиг. 6D

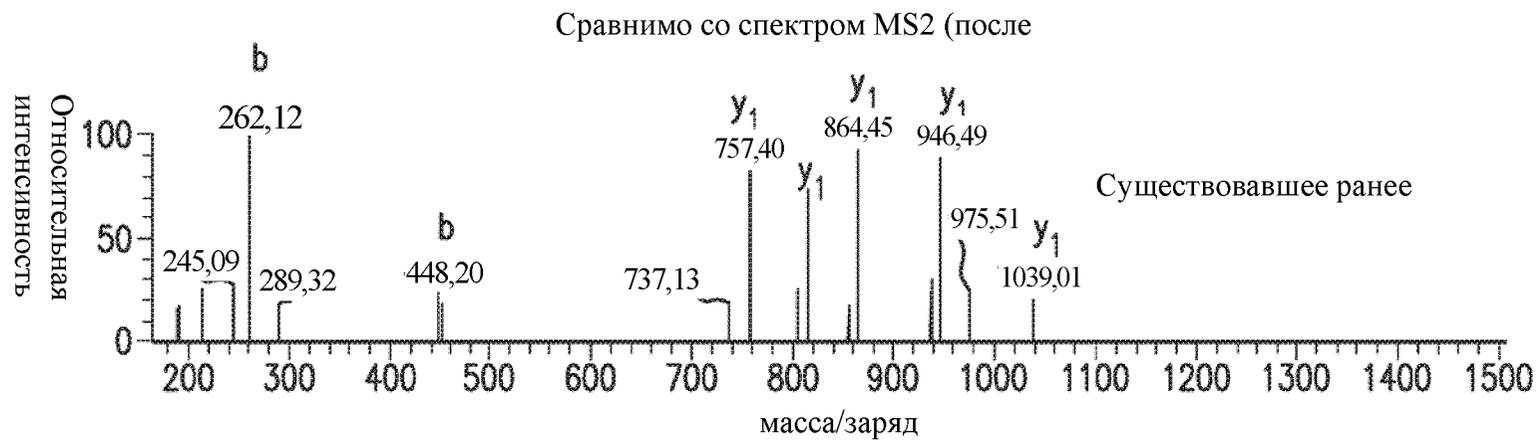
Искусственное  
глюкуронилирование



Фиг. 7А

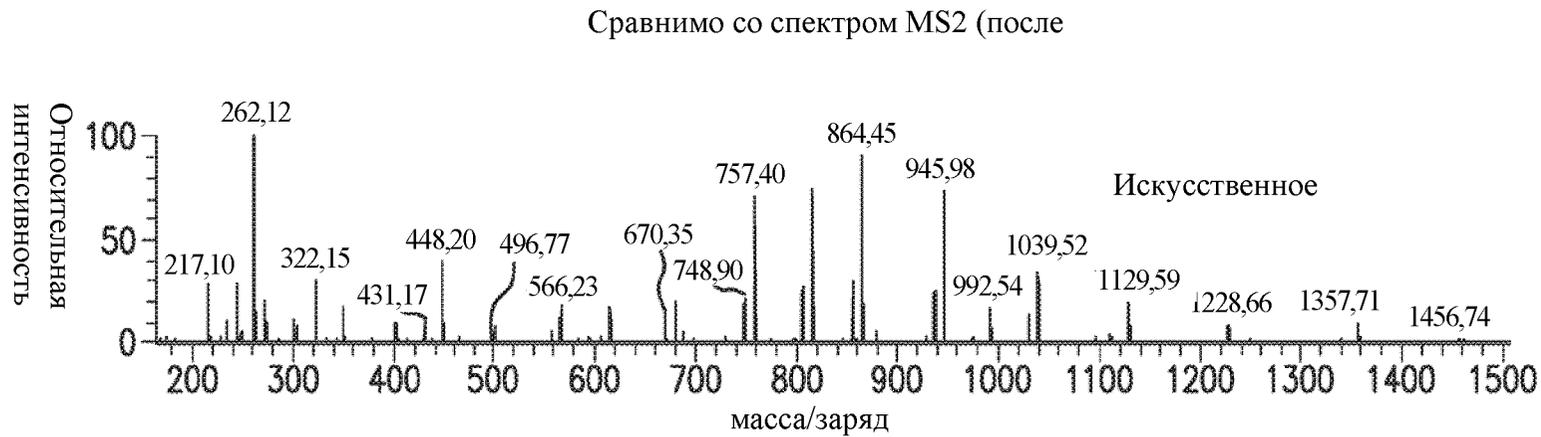


Фиг. 7В



Фиг. 7C

масса/заряд



Фиг. 7D

**PATENT COOPERATION TREATY**

**PCT**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 064752-012PCT1	<b>FOR FURTHER ACTION</b>		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US2019/015549	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 29 January 2019 (29-01-2019)	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 31 January 2018 (31-01-2018)	
Applicant  REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

**1. Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b.  This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).

c.  With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

GLUCURONYLATION AS ACIDIC POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION ON THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant  
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b.  none of the figures is to be published with the abstract

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2019/015549

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-6

### Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2019/015549

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C07K16/00 G01N33/68  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/120613 A1 (SORRENTO THERAPEUTICS INC [US]) 13 July 2017 (2017-07-13) See pages 16, line 21- page 17, line 26 -----	1-6
Y	DATABASE FlyBase [Online] "The modification of a protein by amino acid glucuronylation, the addition of a glucuronate group, the uronic acid derived from glucose", XP002792249, Database accession no. G0:0018321 (Gene Ontology) the whole document -----	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  21 June 2019	Date of mailing of the international search report  12/09/2019
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Nauche, Stéphane
--	--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2019/015549

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017120613 A1	13-07-2017	EP 3400248 A1	14-11-2018
		JP 2019508380 A	28-03-2019
		US 2017247458 A1	31-08-2017
		WO 2017120613 A1	13-07-2017
-----			

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-6

A method for identifying glucuronylation of a protein drug product comprising several well defined steps

---

2. claims: 7-12

A protein drug product comprising a therapeutic protein, wherein less than 3-10% of the therapeutic protein's amino acids are glucuronylated

---

3. claims: 13-19

A method for increasing purity of a protein drug product removing glucuronylated proteins from the protein drug product to produce a purified protein drug product.

---

4. claims: 20-24

A method for identifying post-translationally modified protein drug product

---