

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046201**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.15**

**(51)** Int. Cl. **G16B 5/30** (2019.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**202091621**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.01.31**

---

**(54) КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И МОДЕЛИРОВАНИЕ АТРИБУТОВ КАЧЕСТВА ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

---

**(31)** **62/625,219**

**(32)** **2018.02.01**

**(33)** **US**

**(43)** **2021.02.05**

**(86)** **PCT/US2019/016104**

**(87)** **WO 2019/152682 2019.08.08**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Сюй Сяобинь, Хуан Юй (US)**

**(74)** Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

**(56)** CAI B ET AL.: "C-terminal lysine processing of human immunoglobulin G2 heavy chain in vivo", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 108, no. 2, 11 February 2011 (2011-02-11), pages 404-412, XP055129757, ISSN: 0006-3592, DOI: 10.1002/bit.22933, cited in the application, abstract, p.404 col.2 par.2-3; p.405 col.1 par.1; p.409 par. bridging col.1-2; p.410 col.1 par.2-col.2 par.3.; figures 3, 4, 6, 7

LI Y ET AL.: "Quantitation and pharmacokinetic modeling of therapeutic antibody quality attributes in human studies", MABS, vol. 8, no. 6, 24 May 2016 (2016-05-24), pages 1079-1087, XP055318627, US, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2016.1186322, cited in the application, abstract, par. bridging pp.1084-1085; p.1086, "Pharmacokinetic modeling"; figures 5, 6; table 1

LIU Y D ET AL.: "Human antibody Fc deamidation in vivo", BIOLOGICALS, ACADEMIC PRESS LTD., LONDON, GB, vol. 37, no. 5, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 313-322, XP026574348, ISSN: 1045-1056, DOI: 10.1016/J.BIOLOGICALS.2009.06.001 [retrieved on 2009-07-15] abstract, p.319 par. over col.1-2; p.320 col.2 par.3-p.321 col.1 par.2.; figure 8

GOETZE A MET AL.: "Assessing monoclonal antibody product quality attribute criticality through clinical studies", MABS, vol. 2, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 500-507, XP055317650, US, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.2.5.12897, cited in the application, the whole document

---

**(57)** Представлены способы прогнозирования сывороточной концентрации in vivo антителя с представляющей интерес посттрансляционной модификацией после введения антителя, в виде способов прогнозирования воздействия на субъекта посттрансляционных вариантов антителя. Способы включают в себя прогнозирование процентного содержания антителя с представляющей интерес посттрансляционной модификацией с использованием константы скорости in vivo, определенной для данной посттрансляционной модификации; и умножение прогнозируемого процентного содержания антителя с представляющей интерес посттрансляционной модификацией на концентрацию антителя in vivo для определения концентрации антителя с представляющей интерес посттрансляционной модификацией.

---

**B1**

**046201**

**046201 B1**

### Перечень последовательностей

В данную заявку включен путем ссылки перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10421WO01-Sequence.txt, созданного 31 января 2019 года и содержащего 514 байт информации.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к биофармацевтическим препаратам и относится к прогнозированию и моделированию *in vivo* посттрансляционных модификаций терапевтических антител.

### Уровень техники

Терапевтические моноклональные антитела (mAb) - это гетерогенные молекулы, вырабатываемые в клетках млекопитающих, с большим количеством вариантов продуктов, в том числе вариантов, возникающих в результате посттрансляционных модификаций (ПТМ). Варианты, произведенные с помощью ПТМ, могут возникать в течение всей продолжительности существования mAb во время производства, очистки, хранения и после введения. Эти варианты или связанные с продуктом модификации также называют модификациями, связанными с продуктом, также называются атрибутами качества продукта (PQA). Контроль PQA в рамках предварительно определенных критериев приемлемости является жизненно важным для биофармацевтической отрасли, поскольку он обеспечивает стабильное качество продукции и снижает потенциальное влияние на безопасность и эффективность лекарственных средств. Изменения, которые происходят во время производства и хранения лекарственных средств, часто могут надежно отслеживаться и контролироваться. Однако после введения лекарственных средств могут происходить дополнительные модификации в связи с тем, что условия среды кровотока значительно отличаются от условий буферов рецептур. *In vivo* модификации mAb, как правило, трудно отслеживать и их намного реже изучают. Оценка и прогнозирование изменений ПТМ *in vivo* не только облегчила бы понимание критичности атрибутов качества для оценки риска, связанного с продуктом, но и также помогла командам исследователей и разработчиков продуктов конструировать потенциальные лекарственные средства на основе mAb с повышенной стабильностью *in vivo*.

В руководстве для промышленности Управления по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств рекомендуется, чтобы спонсоры оценивали восприимчивость терапевтических белков к модификациям в среде *in vivo* (см. Guidance for Industry, Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. 2014). В результате этого требования в образцах животного происхождения и человеческой природы было исследовано поведение *in vivo* многих PQA, включая дезамидирование (см., например, Huang et al., Analytical chemistry 2005; 77:1432-9; Ouellette et al., mAbs 2013; 5:432-44; Yin et al., Pharmaceutical research 2013; 30:167-78; Li et al., mAbs 2016:0; Li et al., mAbs 2016:0), окисление (см., например, Yin et al., Pharmaceutical research 2013; 30:167-78; Li et al., mAbs 2016:0; Li et al., mAbs 2016:0), гликирование (см., например, Goetze et al., Glycobiology 2012; 22:221-34), гликозилирование (см., например, Li et al., mAbs 2016:0; Li et al., mAbs 2016:0; Goetze et al., Glycobiology 2011; 21:949-59; Alessandri et al., mAbs 2012; 4:509-20.), дисульфиды (см., например, Li Yet al., mAbs 2016:0; Liu et al., The Journal of biological chemistry 2008; 283:29266-72), N-концевой пироглутамат (см., например, Yin et al., Pharmaceutical research 2013; 30:167-78; Li et al., mAbs 2016:0; Li et al., mAbs 2016:0; Liu et al., The Journal of biological chemistry 2011; 286:11211-7) и удаление C-концевого лизина (см., например, Li et al., mAbs 2016:0; Cai et al., Biotechnology and bioengineering 2011; 108:404-12). Аффинная очистка часто применяется для выделения терапевтического mAb из образцов сыворотки, чтобы снизить влияние фона эндогенных белков при анализе (см., например, Li et al., mAbs 2016:0; Li et al., mAbs 2016:0). Для исследований на животных в качестве реагента захвата может легко использоваться антитело или антиген против Fc человека; для исследований на людях в качестве реагента захвата может использоваться антиген или антитело, которое специфически распознает уникальную определяющую комплементарную область (CDR) терапевтического mAb. После аффинной очистки для количественного определения относительного содержания вариантов продуктов ПТМ часто используется пептидное картирование методом жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии (ЖХ-МС/МС). Недавно количественную оценку *in vivo* ПТМ объединили с фармакокинетическими (ФК) моделями для оценки образования и исчезновения вариантов продуктов ПТМ и количественной оценки воздействия на субъекта PQA в схемах однократного дозирования (см., например Li et al., mAbs 2016:0; Li et al., mAbs 2016:0; Goetze et al., mAbs 2010; 2:500-7), чтобы облегчить выявление критически важных PQA для оценки риска в отношении продукта. Однако не было предпринято попыток моделирования, имитирующего прогрессирование ПТМ *in vivo* и воздействие на субъекта PQA, для количественной оценки критичности PQA в схемах многократного дозирования, не было предпринято.

### Сущность изобретения

В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ прогнозирования *in vivo* сывороточной концентрации антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией после однократного введения антитела, причем способ (a) прогнозирование процентного содержания антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией с использованием константы скорости посттрансляционной модификации *in vivo*, определенной для данной посттрансляционной модификации; и (b) умножение прогнозируемого процентного содержания антитела с представляющей интерес по-

сттрансляционной модификацией на концентрацию антитела *in vivo* для определения концентрации антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией. В некоторых случаях при расчетах применяют следующее уравнение:  $C_{\text{ПТМ}}(t) = C(t) \cdot P(t)$ , где  $C_{\text{ПТМ}}(t)$  представляет собой сывороточную концентрацию антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией;  $C(t)$  представляет собой сывороточную концентрацию антитела и  $P(t)$  представляет собой процентное содержание представляющей интерес посттрансляционной модификации.

В некоторых вариантах осуществления константу скорости *in vivo* для посттрансляционной модификации определяют количественным определением процентного содержания представляющей интерес посттрансляционной модификации в виде функции времени и подбором количественного процентного содержания представляющей интерес посттрансляционной модификации по данному уравнению

$$P_{\text{ПТМ}}(t) = 1 - (1 - P_0) \cdot e^{-k_{\text{ПТМ}} t},$$

где  $P_{\text{ПТМ}}(t)$  представляет собой долю посттрансляционной модификации в виде функции времени;  $P_0$  представляет собой исходное процентное содержание посттрансляционной модификации и  $k_{\text{ПТМ}}$  представляет собой константу скорости посттрансляционной модификации.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение воздействия на субъекта антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией. В некоторых случаях определение воздействия на субъекта антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией включает определение площади под кривой (AUC) концентрации ( $C_{\text{ПТМ}}(t)$ ) антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией.

В некоторых вариантах осуществления сывороточную концентрацию антитела описывают уравнением двухкомпарментной фармакокинетической модели в виде  $C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ , где  $A$  и  $B$  представляют собой гибридные коэффициенты при условии, что  $\alpha$  и  $\beta$  представляют собой гибридные константы первого порядка соответственно.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает прогнозирование сывороточной концентрации *in vivo* антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией после многократных введений антитела. В некоторых случаях прогнозирование сывороточной концентрации *in vivo* антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией после многократных введений антитела включает в себя суперпозицию множества моделей однократных введений, причем сывороточная концентрация антитела при каждом введении описывается по отдельности уравнением двухкомпарментной фармакокинетической модели в виде  $C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ , где  $A$  и  $B$  представляют собой гибридные коэффициенты при условии, что  $\alpha$  и  $\beta$  представляют собой гибридные константы первого порядка соответственно.

В различных вариантах осуществления способа антитело включает в себя рекомбинантное терапевтическое моноклональное антитело. В некоторых случаях посттрансляционная модификация включает в себя атрибут качества продукта, который может влиять на стабильность, безопасность и/или эффективность лекарственного средства.

В некоторых вариантах осуществления способ прогнозировано отслеживает профиль посттрансляционной модификации моноклонального антитела.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает создание прогностической модели прогрессирования *in vivo* посттрансляционных модификаций и воздействия на субъекта атрибутов качества продукта.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает моделирование корреляции между ФК концентрацией и долей вариантов посттрансляционной модификации.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает количественное оценивание и прогнозирование воздействия на субъекта репрезентативной посттрансляционной модификации в схемах как однократного, так многократного дозирования.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает прогнозирование максимального и минимального уровней посттрансляционной модификации, наблюдаемых в схемах многократного дозирования.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ прогнозирования воздействия на субъекта варианта рекомбинантного терапевтического моноклонального антитела после его введения субъекту, причем способ включает (a) идентификацию константы скорости для процесса посттрансляционной модификации (ПТМ), который вызывает образование данного варианта; (b) расчет предполагаемой доли варианта в виде функции времени; (c) расчет прогнозируемой сывороточной концентрации данного варианта у субъекта в виде функции времени на основе прогнозируемой доли данного варианта; и (d) прогнозирование воздействия на субъекта данного варианта после введения антитела на основе прогнозируемой сывороточной концентрации данного варианта.

В некоторых вариантах осуществления способа расчет прогнозируемой доли варианта в виде функции времени выполняют посредством следующего уравнения:  $P_{\text{ПТМ}}(t) = 1 - (1 - P_0) \cdot e^{-k_{\text{ПТМ}} t}$ , где  $P_{\text{ПТМ}}(t)$  представляет собой долю варианта в виде функции времени,  $P_0$  представляет собой исходный уровень варианта в момент введения,  $k_{\text{ПТМ}}$  представляет собой константу скорости процесса ПТМ и  $t$  представля-

ет собой время.

В некоторых вариантах осуществления способа расчет прогнозируемой сывороточной концентрации варианта у субъекта в виде функции времени выполняют посредством следующего уравнения:  $C_{\text{ПТМ}}(t) = C(t) \cdot P_{\text{ПТМ}}(t)$ , где  $C_{\text{ПТМ}}(t)$  представляет собой сывороточную концентрацию варианта,  $C(t)$  представляет собой сывороточную концентрацию антитела и  $P_{\text{ПТМ}}(t)$  представляет собой долю варианта в момент времени  $t$ .

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антитела субъекту.

В некоторых вариантах осуществления способа антитело представляет собой mAb.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение у субъекта общей концентрации антитела *in vivo*.

В другом аспекте в настоящем изобретении предложен способ прогнозирования воздействия на субъекта варианта рекомбинантного терапевтического моноклонального антитела после введения субъекту многократных доз антитела, причем метод включает в себя: (a) выполнение метода, непосредственно описанного выше; (b) расчет прогнозируемой доли варианта до и после каждой последующей дозы антитела на основе интервала дозирования; (c) расчет прогнозируемой сывороточной концентрации варианта у субъекта на основе прогнозируемой доли варианта на каждом интервале дозирования; и (d) прогнозирование воздействия на субъекта данного варианта на протяжении курса приема двух или более доз антитела на основе прогнозируемой сывороточной концентрации данного варианта.

В различных вариантах осуществления обсуждаемых выше или в данном документе способов посттрансляционная модификация включает в себя одно или более из дезамидирования, окисления, гликирования, образования дисульфидов, образования N-концевого пироглутамата, удаления C-концевого лизина и гликозилирования с высоким содержанием маннозы.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антитела субъекту.

В некоторых вариантах осуществления способа антитело представляет собой mAb.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение у субъекта общей концентрации антитела *in vivo*.

Любой из различных аспектов или вариантов осуществления, обсуждаемых выше или в данном документе, может сочетаться в альтернативных вариантах осуществления, каждый из которых охватывается рамками настоящего описания.

#### Описание графических материалов

На фиг. 1 представлен набор графиков, показывающих извлечение белка MAB1 методом аффинной очистки. Степень извлечения при аффинной очистке MAB1 составила >99,5% при <0,5% общем содержании MAB1, обнаруженном в пропускаемом потоке. Расчет процента степени извлечения описан в разделе "Материалы и методы" примера 1. С каждым образцом в качестве внутреннего контроля нормализации анализировали известное количество стандарта с высокомолекулярной массой (показан как "верхний маркер"). Рассчитывали соотношение площади пика MAB1 к площади пика верхнего маркера в каждом образце для корректирования вариативности от анализа к анализу.

На фиг. 2А и 2В представлены примеры МС/МС-спектров идентификации пептидов (фиг. 2А) и типовых хроматограмм выделенных ионов с целью интегрирования пиков и количественного определения ПТМ (фиг. 2В). (фиг. 2А) МС/МС-спектр типового пептида с окисленным Met, DTLMISR (SEQ ID NO: 1) (верхнее изображение) и МС/МС-спектр типового пептида дикого типа, DTLMISR (SEQ ID NO: 1) (нижнее изображение). (фиг. 2В) Хроматограмма выделенного иона пептида с окисленным Met, DTLMISR (SEQ ID NO: 1) (верхнее изображение) и МС/МС-спектр типового пептида дикого типа, DTLMISR (SEQ ID NO: 1) (нижнее изображение).

На фиг. 3А и 3В представлены графики, показывающие относительное содержание дезамидирования на каждом из трех сайтов Asn в Fc-области MAB1 из ФК исследования однократного дозирования (фиг. 3А) и ФК исследования многократного дозирования ФК (фиг. 3В). (фиг. 3А) В исследовании однократного дозирования относительное содержание дезамидирования на каждом из сайтов Asn увеличивалось с течением времени с различными скоростями, соответствуя кинетическому уравнению первого порядка:

$$P_{\text{дезам.}}(t) = 1 - (1 - P_0) \cdot e^{-k_{\text{дезам.}} \cdot t}$$

С применением нелинейной регрессии определили константы скорости дезамидирования *in vivo* на сайтах Asn 1, 2 и 3, равные соответственно 0,003523% день<sup>-1</sup>; 0,5394% день<sup>-1</sup> и 0,1546% день<sup>-1</sup>. (фиг. 3В) В исследовании многократного дозирования относительное содержание дезамидирования на каждом из трех сайтов Asn увеличивалось в течение каждого интервала дозирования, соответствуя кинетическому уравнению первого порядка, но резко уменьшалось, соответствуя каждой последующей дозе, благодаря разведению нововведенным немодифицированным MAB1, проявляя восходящую тенденцию шаблона "зубьев пилы". Каждый момент дозирования показан стрелкой "↑".

На фиг. 4А и 4В представлены графики, показывающие относительное содержание дезамидирования на каждом из трех сайтов Asn в Fc-областях MAB1 из ФК исследования однократного дозирования (фиг. 4А) и ФК исследования многократного дозирования (фиг. 4В). (фиг. 4А) В исследовании однократ-

ного дозирования относительное содержание окисления Met незначительно колебалось, но оставалась практически неизменной во всех трех сайтах. (фиг. 4B) В исследовании множественных доз относительное содержание окисления на сайте 1 Met слегка уменьшалось в течение каждого интервала дозирования и слегка увеличивалась после каждой дозы. Относительные содержания окисления на сайтах 2 и 3 Met оставались стабильными. Каждый момент дозирования показан стрелкой "↑".

На фиг. 5A и 5B представлены графики, показывающие относительные содержания N-концевого пироглутамата из ФК исследования однократного дозирования (фиг. 5A) и ФК исследования многократного дозирования (фиг. 5B). (фиг. 5A) В исследовании однократного дозирования относительное содержание N-концевого пироглутамата увеличивалось с течением времени. (фиг. 5B) В исследовании многократного дозирования относительное содержание N-концевого пироглутамата увеличивалось в течение каждого интервала дозирования, но резко уменьшалось, соответствуя каждой последующей дозе MAB1, благодаря разведению нововведенным немодифицированным MAB1, проявляя восходящую тенденцию шаблона "зубьев пилы". Каждый момент дозирования показан стрелкой "↑".

На фиг. 6A и 6B представлены графики, показывающие относительные содержания наличия C-концевого лизина тяжелой цепи MAB1 из ФК исследования однократного дозирования (фиг. 6A) и ФК исследования многократного дозирования (фиг. 6B). В обоих исследованиях однократного и многократного дозирования C-концевой лизин быстро удалялся в пределах одних суток после каждой дозы. Каждый момент дозирования показан стрелкой "↑".

На фиг. 7A и 7B представлены графики, показывающие относительные содержания гликоформы маннозы 5 из ФК исследования однократного дозирования (фиг. 7A) и ФК исследования многократного дозирования (фиг. 7B). (фиг. 7A) В исследовании однократного дозирования относительное содержание варианта маннозы 5 уменьшалось с 0,5% до не выявляемого уровня в течение 6 недель. (фиг. 7B) В исследовании многократного дозирования относительное содержание варианта маннозы 5 уменьшалось в течение каждого интервала дозирования, но резко увеличивалось при каждой последующей новой дозе, поскольку нововведенный MAB1 с более высоким уровнем варианта маннозы 5, проявлял восходящую тенденцию шаблона "зубьев пилы". Каждый момент дозирования показан стрелкой "↑".

На фиг. 8A представлен график, показывающий воздействие на субъекта общего содержания MAB1 из ФК исследования однократного дозирования. Кривая зависимости сывороточной концентрации MAB1 от времени (черная линия), описанная уравнением двухкомпарментной фармакокинетической модели как  $C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ , была подобрана по измеренным твердофазным ИФА сывороточным концентрациям MAB1 (черные точки). Определили воздействие на субъекта общего содержания MAB1 на протяжении курса лечения из 56 суток, представленное кривой AUC C(t), равное 4302,0 мкг/мл-сутки.

На фиг. 8B представлен график, показывающий воздействие на субъекта MAB1 с PQA из исследования однократного дозирования. Кривая зависимости сывороточной концентрации от времени MAB1 с дезамидированием описано как  $C_{PQA}(t) = C(t) \cdot P_{PQA}(t)$ . AUC кривой  $C_{PQA}(t)$  соответствует воздействию на субъекта MAB1 с данным PQA. Воздействие на субъекта MAB1 с дезамидированием на сайте Asn 2 на протяжении 56 суток определили равной 426,7 мкг/мл-сутки (сплошная линия). Воздействие на субъекта MAB1 с дезамидированием на сайте Asn 3 на протяжении 56 суток определили равной 152,5 мкг/мл-сутки (штриховая линия). Воздействие на субъекта MAB1 с N-концевым пироглутаматом на протяжении 56 суток определили равной 191,5 мкг/мл-сутки (пунктирная линия).

Фиг. 9A представляет собой график, показывающий прогнозирования модели и экспериментальные измерения сывороточной концентрации общего MAB1 и MAB1 с дезамидированием на сайте Asn 2 или сайте Asn 3 из ФК исследования многократного дозирования. Прогнозируемые сывороточные концентрации общего MAB1 и MAB1 с дезамидированием на сайте Asn 2 или сайте Asn 3 до и после получения доз хорошо согласуются с экспериментальными измерениями. Концентрации общего MAB1 и MAB1 с дезамидированием на сайте Asn 2 или 3 до и после получения доз приходят к равновесным уровням после продолжительного периода дозирования.

Фиг. 9B представляет собой график, показывающий прогнозирования модели и экспериментальные измерения относительных содержаний дезамидирования на сайте Asn 2 или сайте Asn 3. Прогнозируемые уровни хорошо согласуются с экспериментальными значениями. Относительные содержания дезамидирования на сайте Asn 2 или сайте Asn 3 до и после получения доз приходят к равновесным уровням после продолжительного периода дозирования. Каждый момент дозирования показан стрелкой "↑".

Фиг. 10A представляет собой график, показывающий прогнозирования модели и экспериментальные измерения сывороточной концентрации MAB1 с N-концевым пироглутаматом из ФК исследования многократного дозирования. Прогнозируемые сывороточные концентрации MAB1 с N-концевым пироглутаматом до и после получения доз хорошо согласуются с экспериментальными измерениями. Концентрации MAB1 с N-концевым пироглутаматом до и после получения доз приходят к равновесным уровням после продолжительного периода дозирования.

Фиг. 10B представляет собой график, показывающий прогнозирования модели и экспериментальные измерения относительных содержаний N-концевого пироглутамата. Прогнозируемые уровни хорошо согласуются с экспериментальными значениями. Относительные содержания N-концевого пирог-

лутамата до и после получения доз приходят к равновесным уровням после продолжительного периода дозирования. Каждый момент дозирования показан стрелкой "↑".

Фиг. 11А и 11В представляют собой графики, показывающие моделирование воздействия на субъекта гипотетического CDR-дезамидирования со скоростью дезамидирования *in vivo* 2,5% в сутки<sup>1</sup> и исходные уровни дезамидирования 0%, 10% и 20% в исследовании однократного дозирования (фиг. 11А) и исследовании многократного дозирования (фиг. 11В). (фиг. 11А) Воздействие на субъекта гипотетических CDR-дезамидированных вариантов с 0%, 10% и 20% исходным дезамидированием на протяжении 56 суток в исследовании однократного дозирования составляет 1385 мкг/мл сутки, 1653 мкг/мл сутки и 1921 мкг/мл сутки, соответственно составляя 32,5%, 38,8% и 45,1% воздействия на субъекта общего содержания mAb, соответственно. (фиг. 11В) Воздействие на субъекта гипотетических CDR-дезамидированных вариантов с 0%, 10% и 20% исходным дезамидированием на протяжении 5 доз (56 суток) в исследовании многократного дозирования составляет 1086 мкг/мл сутки, 1478 мкг/мл сутки и 1871 мкг/мл сутки, соответственно составляя 21,7%, 29,5% и 37,3% воздействия на субъекта общего содержания mAb, соответственно. Каждый момент дозирования показан стрелкой "↑".

Фиг. 12 представляет собой блок-схему компьютерной системы, которая может использоваться для реализации аспектов настоящего описания.

Фиг. 13 представляет собой схему распределенного вычислительного окружения, в котором могут реализовываться аспекты настоящего описания.

### Подробное описание изобретения

Перед описанием настоящих способов, следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными способами и описываются экспериментальные условия, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Следует также понимать, что используемая здесь терминология приведена только с целью описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя в практической реализации или апробации настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным здесь, в настоящий момент описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Использованные в данном документе сокращения:

Asn: аспарагин;

AUC: площадь под кривой;

CDR: определяющая комплементарность область;

КВ: коэффициент вариаций;

EIC: хроматограмма выделенного иона;

ИФА: твердофазный иммуноферментный анализ

FDA: управление по контролю за качеством продуктов и лекарственных средств США;

НС: тяжелая цепь;

IgG: иммуноглобулин G;

LC: легкая цепь;

mAb: моноклональное антитело;

MAb1: терапевтическое моноклональное антитело человека, используемое в примере 1;

Met: метионин;

ФК: фармакокинетика;

PQA: атрибут качества продукта;

ПТМ: посттрансляционная модификация;

ОФ-ЖХ-МС/МС: обращенно-фазовая жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией.

### Определения

Термин "антитело" при использовании в данном документе предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей взаимосвязанных дисульфидными связями (т.е., "полных молекул антител"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (HCVR или V<sub>H</sub>) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). В различных вариантах осуществления тяжелая цепь может представлять собой изотип IgG. В некоторых случаях тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь представляет собой изотип IgG1 или IgG4, необязательно включая химерный шарнирный участок изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (LCVR или V<sub>L</sub>) и константной области легкой цепи (C<sub>L</sub>). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут далее разделяться на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарность

областями (CDR), перемежающиеся областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  состоит из трех CDR и четырех FR, упорядоченных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает в себя обозначение как гликозилированных, так и негликозилированных иммуноглобулинов любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает в себя молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, например антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной с целью экспрессии антитела. Для получения обзора структуры антител см. Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) *Dev. Comp. Immunol.* 55-77 (2003); и M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1) *Surv. Immunol. Res.* 27-42 (1983).

Термин "антитело" также охватывает "биспецифическое антитело", которое включает в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, способный связываться с более чем одним отличающимся эпитопом. Одна половина биспецифического антитела, включающая в себя одну тяжелую цепь и одну легкую цепь и шесть CDR, связывается с одним антигеном или эпитопом, а другая половина антитела связывается с другим антигеном или эпитопом. В некоторых случаях биспецифическое антитело может связывать один и тот же антиген, но по разным эпитопам или неперекрывающимся эпитопам. В некоторых случаях обе половины биспецифического антитела имеют идентичные легкие цепи, сохраняя при этом двойную специфичность. Биспецифические антитела в целом описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527 (30 декабря 2010 года).

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или "фрагмент антитела"), относится к одному или более фрагментам антитела, сохраняющим способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охваченных рамками термина "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) Fab-фрагмент -моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент - бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH антитела с одним плечом, (v) dAb-фрагмент (Ward et al. (1989) *Nature* 241:544-546), который содержит домен VH, (vi) выделенную CDR, и (vii) scFv, который состоит из двух доменов Fv-фрагмента, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием единой белковой цепи, в которой спарены области VL и VH с образованием моновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином "антитело" (см., например, Holliger et al. (1993) 90 *PNAS U.S.A.* 6444-6448; и Poljak et al. (1994) 2 *Structure* 1121-1123).

Более того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут получать с использованием стандартных методик рекомбинантных ДНК, широко известных в данной области техники (см. Sambrook et al., 1989).

"Fc-белки слияния" содержат часть или все из двух или более белков, один из которых является Fc-частью молекулы иммуноглобулина, которые иначе не встречаются вместе в природных условиях. Описано получение белков слияния, содержащих определенные гетерологические полипептиды, слитые с различными частями производных от антител полипептидов (в том числе Fc-домен), например Ashkenazi et al., (1991) 88 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 10535; Byrn et al., (1990) 344 *Nature* 677; и Hollenbaugh et al., (1992) "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11. "Рецепторные Fc-белки слияния" содержат один или более внеклеточных доменов рецептора, соединенного с Fc-фрагментом, которые в некоторых вариантах осуществления содержат шарнирную область с последующими доменами CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления Fc-белок слияния содержит две или более различные рецепторные цепи, которые связываются с одним или более лигандами. Например, Fc-белок слияния представляет ловушку, как например ловушку IL-1 (например, рилонцепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RACp, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6,927,004), или ловушку VEGF (например, афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 из VEGF-рецептора Flt1, слитого с Ig-доменом 3 из VEGF-рецептора Flk1, слитого с Fc hIgG1; см. патент США № 7,087,411 (опубликован 8 августа 2006 г.) и патент США № 7,279,159 (опубликован 9 октября 2007 г.)).

Термин "антитело человека" предназначен для охвата антител, содержащих вариативные и константные области, полученные из эмбриональных иммуноглобулиновых последовательностей человека. mAb человека по данному изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, некодируемые эмбриональными иммуноглобулиновыми последовательностями человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например в CDR и, в частности, CDR3. Тем не менее, термин "антитело человека" при использовании в данном документе не предназначен охватывать mAb, в которых последовательности CDR получены от эмбриональных линий других видов млекопитающих (например, мыши), которые привиты на FR-последовательности человека. Этот термин включает в себя антитела, рекомбинантно полученные в млекопитающем, не являющемся человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Этот термин не предназначен для охвата антител, выделенных или созданных в субъекте-человеке.

Как используется в данном документе, термин "субъект" относится к животному, предпочтительно

млекопитающему, предпочтительнее человеку, например, нуждающемуся в облегчении, предотвращении и/или лечении заболевания или нарушения.

Как используется в данном документе, термин "лечить", "лечащий" или "лечение" относится к снижению или облегчению тяжести по меньшей мере одного симптома или показания, благодаря введению терапевтического агента, такого как антитела по данному изобретению нуждающемуся в этом субъекту. Термин включает в себя ингибирование прогрессирования заболевания. Терапевтический агент может вводиться субъекту в терапевтической дозе.

Термин "посттрансляционная модификация" (ПТМ) относится к ковалентной модификации белков после биосинтеза белков. Посттрансляционные модификации могут происходить на боковых цепях аминокислот или на С- или N-концах белков. Примеры посттрансляционных модификаций антител включают в себя дезамидирование, окисление, гликирование, образование дисульфидов, образование N-концевого пироглутамата, удаление С-концевого лизина и гликозилирование.

#### **Общее описание изобретения**

Терапевтические моноклональные антитела (mAb), полученные из клеток млекопитающих, являются гетерогенными в результате посттрансляционных модификаций (ПТМ). ПТМ терапевтических моноклональных антител (mAb) являются важными атрибутами качества продуктов (PQA), которые потенциально могут повлиять на их стабильность, безопасность и эффективность (Xu et al., *Journal of Applied Bioanalysis* 2017; 3:21-5). ПТМ могут происходить во время производства, очистки, хранения и после введения mAb (Kozlowski et al., *Advanced drug delivery reviews* 2006; 58:707-22; Liu et al., *Journal of pharmaceutical sciences* 2008; 97:2426-47; Goetze et al., *mAbs* 2010; 2:500-7; Wang et al., *Journal of pharmaceutical sciences* 2007; 96:1-26). Модификации, которые происходят во время производства и хранения лекарственных средств, часто могут надежно отслеживаться и контролироваться. Однако после приема лекарств могут происходить дополнительные модификации в результате различных условий окружающей среды, с которыми встречаются mAb *in vivo* по сравнению с условиями *in vitro*. ПТМ mAb заметно изменяются после введения в кровоток по сравнению с условиями *in vitro*. Таким образом, мониторинг изменений ПТМ mAb *in vivo* помогает оценивать критичность PQA при оценке риска, связанного с продуктом. Кроме того, количественная оценка воздействия на субъекта вариантов ПТМ помогает оценивать влияние ПТМ на безопасность и эффективность терапевтических mAb. Оценка и прогнозирование ПТМ, которые могут происходить *in vivo*, не только облегчает понимание критичности атрибутов качества для оценки риска, связанного с продуктом, но и также помогает командам разработчиков продуктов конструировать потенциальные лекарственные средства на основе mAb с повышенной стабильностью *in vivo*.

Как описано в настоящем документе, изобретатели провели подробный анализ и определение атрибутов качества продуктов (PQA), которые имеются у терапевтических моноклональных антител. Используя в качестве модели терапевтическое моноклональное антитело MAV1, изобретатели оценили ряд посттрансляционных модификаций, включая, например, дезамидирование, окисление, образование N-концевого пироглутамата и удаление С-концевого лизина. Как описано в данном документе, в фармакокинетических (ФК) исследованиях однократного и многократного дозирования изобретатели определили ПТМ (например, дезамидирование, окисление, образование N-концевого пироглутамата, удаление С-концевого лизина и гликозилирование с высоким содержанием маннозы) терапевтического mAb, MAV1. Используя полученные данные, изобретатели построили уравнения моделирования для расчета сывороточных концентраций PQA *in vivo*, воздействия на субъекта PQA и относительного содержания PQA в схемах однократного и многократного дозирования на примерах трех распространенных ПТМ. Прогнозы модели продемонстрировали согласование с экспериментальными результатами. Пример применения моделей был установлен с использованием гипотетической ПТМ. Модели предоставляют химикам-биоаналитикам упрощенный инструмент моделирования для количественной оценки критичности PQA при отсутствии расширенных ФК моделей. Как подробно показано ниже в примере, образцы сыворотки обезьян из ФК исследований однократного и многократного дозирования анализировали с помощью аффинной очистки, с последующей ЖХ-МС/МС для определения ряда посттрансляционных атрибутов MAV1. Используя данные, полученные в результате этого анализа, изобретатели смогли построить математическую модель и/или имитацию *in vivo* прогрессирования посттрансляционных модификаций антител с целью прогнозировать воздействие на субъекта атрибутов качества терапевтического антитела. Имитация обеспечивает количественный подход к оценке критичности PQA.

На основе ФК исследования PQA MAV1 однократного дозирования, изобретатели смогли моделировать ФК концентрацию и долю вариантов ПТМ, а также количественно оценивать и прогнозировать воздействие на субъекта репрезентативного атрибута ПТМ (например, дезамидирования аспарагина) в схемах как однократного, так и многократного дозирования. Модель также предсказывает максимальные и минимальные уровни ПТМ, наблюдаемые при схемах многократного дозирования. Такой подход к моделированию предоставляет химикам-биоаналитикам новый инструмент для количественной оценки критичности PQA у терапевтических mAb. Модели могут использоваться для оценки влияния на PQA, вызванные изменениями технологического процесса или вариабельностью от серии к серии, путем корректировки исходных уровней PQA ( $P_0$ ). Если моделирование показало, что прогрессирование PQA или воздействие на субъекта PQA нечувствительны к исходным уровням PQA, допустимые диапазоны PQA мо-

гут быть расширены, чтобы воспринимать изменения технологического процесса.

Модели также могут быть использованы для имитации воздействия на субъекта путем продления периода дозирования ( $t$ ) или изменения интервала дозирования ( $\tau$ ), обеспечивая количественную оценку воздействия на субъекта PQA в доклинических и клинических исследованиях. Количественная оценка воздействия на субъекта PQA может помочь оценивать риски, связанные с PQA. PQA с известными побочными иммунологическими реакциями, который, как было установлено, имеет высокий уровень воздействия в ходе ФК исследований, будет иметь высокий потенциальный риск. В таких случаях могут быть реализованы определенные стратегии (например, реинжиниринг белков для повышения стабильности *in vivo*) для устранения или снижения уровня PQA.

Метод прогнозирования воздействия атрибутов качества продуктов-антител

Описанное в данном документе представляет собой способ прогнозирования *in vivo* сывороточной концентрации антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией после введения антитела (такого как терапевтическое моноклональное антитело) субъекту. Описанный способ включает прогнозирование процентного содержания антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией с использованием константы скорости *in vivo*, определенной для представляющей интерес посттрансляционной модификации. Процентное содержание антитела с посттрансляционной модификацией может умножаться на общую концентрацию антитела *in vivo* в любой момент времени для определения концентрации антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией в тот момент времени. Например, использование уравнения  $C_{\text{ПТМ}}(t) = C(t) \cdot P(t)$ , где  $C(t)$  представляет собой сывороточную концентрацию антитела; и  $P(t)$  представляет собой процентное содержание представляющей интерес посттрансляционной модификации. Можно определять сывороточную концентрацию ( $C_{\text{ПТМ}}(t)$ ) антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией. Другими словами, сывороточная концентрация антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией представляет собой процентное содержание от общего содержания антитела, имеющего такую посттрансляционную модификацию. Как описано в данном документе, сывороточная концентрация антитела может описываться уравнением двухкомпарментной фармакокинетической модели в виде  $C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ , где  $A$  и  $B$  представляют собой гибридные коэффициенты при условии, что  $\alpha$  и  $\beta$  представляют собой гибридные константы первого порядка соответственно.

В некоторых вариантах осуществления константу скорости *in vivo* для представляющей интерес посттрансляционной модификации определяют количественным определением процентного содержания представляющей интерес посттрансляционной модификации в виде функции времени после однократной дозы и подбором количественного процентного содержания представляющей интерес посттрансляционной модификации по данному уравнению  $P_{\text{ПТМ}}(t) = 1 - (1 - P_0) \cdot e^{-k_{\text{ПТМ}} t}$ , где  $P_{\text{ПТМ}}(t)$  представляет собой долю представляющей интерес посттрансляционной модификации в виде функции времени;  $P_0$  представляет собой исходное процентное содержание представляющей интерес посттрансляционной модификации и  $k_{\text{ПТМ}}$  представляет собой константу скорости посттрансляционной модификации для представляющей интерес посттрансляционной модификации. Путем подбора кривой по измеренному процентному содержанию представляющей интерес посттрансляционной модификации может определяться константа скорости  $k_{\text{ПТМ}}$ , например с помощью нелинейной регрессии или других математических алгоритмов аппроксимации.

В некоторых вариантах осуществления способ также включает определение воздействия на субъекта количества антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией. Например, использование результатов анализа площади под кривой (AUC) для определения концентрации ( $C_{\text{ПТМ}}(t)$ ) антитела представляющей интерес посттрансляционной модификацией на протяжении интересующего периода времени, например суток, недель или даже месяцев, дает значение для общего воздействия на субъекта количества антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией.

Возможен также проверка нескольких сайтов одновременно. Например доли антитела с посттрансляционной модификацией в определенном сайте могут описываться уравнением кинетики первого порядка, как  $P_{\text{ПТМ\_сайт}_i}(t) = 1 - (1 - P_0) \cdot e^{-k_{\text{ПТМ\_сайт}_i} t}$ , где  $P_{\text{ПТМ\_сайт}_i}(t)$  представляет собой долю посттрансляционной модификации на сайте  $i$  в виде функции времени;  $P_0$  представляет собой исходный уровень посттрансляционной модификации такого сайта  $i$ ;  $k_{\text{ПТМ\_сайт}_i}$  представляет собой константу скорости образования посттрансляционной модификации на сайте  $i$ . Таким образом, ФК концентрация антитела с определенным сайтом  $i$  в пределах посттрансляционно модифицированного антитела может описываться как  $C_{\text{ПТМ\_сайт}_i}(t) = C(t) \cdot P_{\text{ПТМ\_сайт}_i}(t)$ . Площадь под кривой (AUC) графика  $C_{\text{ПТМ\_сайт}_i}(t)$  представляет воздействие на субъекта атрибута качества. Специалист может дополнительно рассчитывать приблизительную концентрацию каждого вида варианта антитела, например имеющего 1, 2, 3 или даже более отчетливых посттрансляционных модификаций.

Как обсуждается ниже в примерах применительно к дезамидированию путем расширения модели на множественные введения, описанный в данном документе способ может применяться для прогнозирования сывороточных концентраций *in vivo* антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией после многократных введений антитела. Например, прогнозирование сывороточной кон-

центрации *in vivo* антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией после многократных введений антитела может включать в себя суперпозицию множества моделей однократных введений, причем сывороточная концентрация антитела при каждом введении описывается по отдельности уравнением двухкомпарментной фармакокинетической модели в виде  $C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ , где  $A$  и  $B$  представляют собой гибридные коэффициенты при условии, что  $\alpha$  и  $\beta$  представляют собой гибридные константы первого порядка соответственно.

Сывороточная концентрация антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией непосредственно перед  $m$ -й дозой может быть описана следующим образом:

$$C_{\text{ПТМ},m,\text{переддоз.}}(m \cdot \tau) = P_{\text{ПТМ}}[(m-1) \cdot \tau]C[(m-1) \cdot \tau] + \dots + P_{\text{ПТМ}}(1 \cdot \tau)C(1 \cdot \tau)$$

Сывороточная концентрация антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией непосредственно после  $m$ -й дозы может быть описана следующим образом:

$$C_{\text{ПТМ},m,\text{последоз.}}(m \cdot \tau) = P_{\text{ПТМ}}[(m-1) \cdot \tau]C[(m-1) \cdot \tau] + \dots + P_{\text{ПТМ}}(1 \cdot \tau)C(1 \cdot \tau) + P_{\text{ПТМ}}(0)C(0)$$

где  $P_{\text{ПТМ}}(t)$  представляет собой уравнение реакции первого порядка, как описано для первого введения.

Таким образом, доля антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией непосредственно перед  $m$ -й дозой может быть описана следующим образом:

$$P_{\text{ПТМ},m,\text{переддоз.}}(m \cdot \tau) = \frac{C_{\text{ПТМ},m,\text{переддоз.}}(m \cdot \tau)}{C_{m,\text{переддоз.}}(m \cdot \tau)}$$

Доля антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией непосредственно перед  $m$ -й дозой может быть описана следующим образом:

$$P_{\text{ПТМ},m,\text{последоз.}}(m \cdot \tau) = \frac{C_{\text{ПТМ},m,\text{последоз.}}(m \cdot \tau)}{C_{m,\text{последоз.}}(m \cdot \tau)}$$

Когда  $m$  приближается к бесконечности,  $P_{\text{дезам.},m,\text{переддоз.}}$  и  $P_{\text{ПТМ},m,\text{последоз.}}$  достигают плато, что может описываться следующим образом:

$$P_{\text{ПТМ},\infty,\text{переддоз.}} = \frac{1}{C_{\infty,\text{переддоз.}}} \sum_{j=1}^{\infty} P_{\text{дезам.}}(j) \cdot C(j) = \frac{1}{C_{\infty,\text{переддоз.}}} \sum_{j=1}^{\infty} [1 - (1 - P_0)e^{-k\tau j}] (A \cdot e^{-\alpha \tau j} + B \cdot e^{-\beta \tau j})$$

Следовательно:

$$P_{\text{ПТМ},\infty,\text{переддоз.}} = \frac{A \left( \frac{1}{e^{\alpha\tau} - 1} - \frac{1 - P_0}{e^{(\alpha+k)\tau} - 1} \right) + B \left( \frac{1}{e^{\beta\tau} - 1} - \frac{1 - P_0}{e^{(\beta+k)\tau} - 1} \right)}{\frac{A}{e^{\alpha\tau} - 1} + \frac{B}{e^{\beta\tau} - 1}}$$

$$P_{\text{ПТМ},\infty,\text{последоз.}} = \frac{\left[ A \left( \frac{1}{e^{\alpha\tau} - 1} - \frac{1 - P_0}{e^{(\alpha+k)\tau} - 1} \right) + B \left( \frac{1}{e^{\beta\tau} - 1} - \frac{1 - P_0}{e^{(\beta+k)\tau} - 1} \right) \right] + P_0(A+B)}{\frac{Ae^{\alpha\tau}}{e^{\alpha\tau} - 1} + \frac{Be^{\beta\tau}}{e^{\beta\tau} - 1}}$$

Константы  $A$ ,  $B$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $k$  уравнения могут быть определены аппроксимацией уравнения по экспериментальным результатам, полученным в первом интервале дозирования.

В некоторых вариантах осуществления посттрансляционная модификация включает в себя атрибут качества продукта, который может потенциально влиять на его стабильность, безопасность и/или эффективность. В некоторых вариантах реализации способ представляет собой отслеживание профиля *in vivo* посттрансляционной модификации моноклонального антитела, такого как рекомбинантное терапевтическое моноклональное антитело. В некоторых случаях способ дополнительно включает в себя создание прогностической модели прогрессирования *in vivo* посттрансляционных модификаций и воздействия на субъекта атрибутов качества продукта. В некоторых вариантах осуществления посттрансляционная модификация включает в себя одно или более из дезамидирования, окисления, гликирования, образования дисульфидов, образования N-концевого пироглутамата, удаления C-концевого лизина и/или гликозилирования с высоким содержанием маннозы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя моделирование корреляции между ФК концентрацией и долей вариантов посттрансляционной модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя количественное оценивание и прогнозирование воздействия на субъекта репрезентативной посттрансляционной модификации в схемах как однократного, так и многократного дозирования. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает в себя прогнозирование максимального и минимального уровней посттрансляционной модификации, наблюдаемых в схемах многократного дозирования.

#### Пример компьютерной системы

Со ссылкой на фиг. 12 показана типовая компьютерная система для реализации раскрытого метода, включающая в себя компьютер 120 (такой как персональный компьютер, ноутбук, карманный персо-

нальный компьютер, приставку, сервер, системный блок, портативное устройство и другие разновидности компьютера), в том числе вычислительный блок 121, системную память 122 и системную шину 123, которые соединяют различные компоненты системы, в том числе системную память, с вычислительным блоком 121. В качестве вычислительного блока может использоваться любой из различных коммерческих процессоров, включая INTEL® x86, PENTIUM® и совместимые микропроцессоры от INTEL® и другие, в том числе Cyrix, AMD и Nexgen; Alpha от Digital; MIPS от MIPS Technology, NEC, IDT®, Siemens и другие; а также PowerPC от IBM® и Motorola. В качестве вычислительного блока 121 могут также использоваться двоянные микропроцессоры и другие многопроцессорные архитектуры.

Системная шина может быть любой из нескольких типов структуры шины, включая шину памяти или контроллер памяти, периферийную шину и локальную шину, использующую любую из множества обычных архитектур шины, таких как PCI, VESA, AGP, MicroChannel, ISA и EISA, и это лишь некоторые из них. Базовая система ввода-вывода (BIOS), содержащая основные стандартные программы, которые помогают выполнять перенос информации между элементами внутри компьютера 120, например при запуске, обычно хранится в ПЗУ 124. Системная память включает в себя память только для чтения (ПЗУ) 124 и память случайного доступа (ОЗУ) 125. Компьютер 120 может дополнительно включать жесткий диск 127, дисковод для магнитного диска 128, например для чтения или записи на съемный диск 129, и оптический дисковод 130, например для чтения с CD-ROM диска 131 или для чтения или записи на другие оптические носители. Жесткий диск 127, дисковод для магнитного диска 128 и оптический дисковод 130 подключены к системной шине 123 интерфейсом 132 жесткого диска, интерфейсом 133 магнитного диска и интерфейсом 134 оптического диска соответственно. Дисководы и связанные с ними компьютерные читаемые носители обеспечивают энергонезависимое хранение данных, структур данных (баз данных), компьютерных исполняемых инструкций и т.д. для компьютера 120. Хотя вышеприведенное описание компьютерных читаемых носителей относится к жесткому диску, съемному магнитному диску и CD, специалисты в данной области техники должны понимать, что другие типы носителей, которые читаются компьютером, такие как магнитные кассеты, карты флэш-памяти, цифровые видеодиски, картриджи Бернулли и т.п., также могут быть использованы в типовой операционной среде.

Данные могут храниться в дисководах и ОЗУ 125, в том числе в операционной системе 135, одной или более прикладных программах 136, других программных модулях 137 и программных данных 138. Пользователь может вводить команды и информацию в компьютер 120 с использованием различных устройств ввода, таких как клавиатура 140 и указывающее устройство, такое как мышь 142. Другие устройства ввода (не показаны) могут включать микрофон, спутниковую антенну, сканер и т.п. Эти и другие устройства ввода часто присоединены к вычислительному блоку 121 через интерфейс 146 последовательного порта, который присоединен к системной шине, но могут быть присоединены и посредством других интерфейсов, таких как параллельный порт, игровой порт или универсальная последовательная шина (USB). Монитор 147 или устройство отображения другого типа может быть присоединено к системной шине 123 через интерфейс, такой как видеоадаптер 148. В дополнение к монитору, компьютеры обычно включают в себя другие периферийные устройства вывода (не показаны), такие как принтеры. В качестве альтернативы, носителем отображения является распечатка или другой материальный носитель. Выходная информация может также сохраняться на компьютерном читаемом носителе для хранения и/или последующего использования или отображения.

Компьютер 120 может работать в сетевой среде, используя логические соединения с одной или более другими компьютерными системами, такими как компьютер 102. Другие компьютерные системы могут быть серверами, маршрутизаторами, одноранговыми устройствами или другими общими сетевыми узлами, и обычно включают многие или все из элементов, описанных относительно компьютера 120, хотя на фиг. 12 проиллюстрировано только устройство 149 хранения данных. Логические соединения, изображенные на фиг. 12, включают в себя локальную сеть (LAN) 151 и широкополосную сеть (WAN) 152. Такие сетевые среды распространены в офисах, корпоративных компьютерных сетях, интрасетях и Интернете.

При использовании в сетевой среде LAN компьютер 120 подключается к локальной сети 151 через сетевой интерфейс или адаптер 153. При использовании в WAN-среде компьютер 120 обычно включает в себя модем 154 или другие средства для установления связи (например, через LAN 151 и шлюз или прокси-сервер 155) с глобальной сетью 152, такой как Интернет. Модем 154, который может быть внутренним или внешним, подключается к системной шине 123 через интерфейс 146 последовательного порта. В сетевой среде программные модули, изображенные относительно компьютера 120 или его частей, могут храниться в удаленном запоминающем устройстве. Будет понятно, что показанные сетевые соединения являются примерами и могут быть использованы другие средства установления связи между компьютерными системами (в том числе карта Ethernet, терминальный адаптер ISDN, модем ADSL, адаптер Ю-BaseT, адаптер 100BaseT, адаптер ATM и т.п.).

Способы, включая действия и операции, которые они содержат, описанные выше, могут выполняться компьютером 120 или прибором или другим устройством, которое специально запрограммировано или предназначено для выполнения раскрытых способов. Следовательно, способы могут выполняться

на конкретной машине, например на устройстве, не являющемся компьютером общего назначения. Такие действия и операции иногда называют выполняемыми компьютером. Будет понятно, что к действиям и символически представленным операциям относится манипулирование вычислительным блоком 121 электрическими сигналами, представляющими биты данных, что приводит к результирующему преобразованию или уменьшению представления электрических сигналов, и хранению битов данных в ячейках памяти системы памяти (включая системную память 122, жесткий диск 127, дискеты 129 и CD-ROM 131) для того, чтобы таким образом перенастроить или иным образом изменить работу вычислительной системы, а также прочая обработка сигналов. Ячейки памяти, в которых хранятся биты данных, представляют собой физические ячейки, обладающие особыми электрическими, магнитными или оптическими свойствами, соответствующими битам данных.

#### Пример распределенной вычислительной среды

Фиг. 13 иллюстрирует распределенную вычислительную среду, в которой могут располагаться программное обеспечение и/или элементы баз данных, используемые для реализации способов настоящего раскрытия. Распределенная вычислительная среда 200 включает в себя две компьютерные системы 202, 204, соединенные связующим носителем 206, хотя раскрытый метод в равной степени применим к произвольному более значительному количеству компьютерных систем, соединенных средством 206 подключения. Компьютерные системы 202, 204 могут быть любой из нескольких типов конфигураций компьютерных систем, включая персональные компьютеры, многопроцессорные системы, портативные устройства и т.п. С точки зрения логической связи с другими компьютерными системами, компьютерная система может быть клиентом, сервером, маршрутизатором, одноранговым устройством или другим общим сетевым узлом. Дополнительные компьютерные системы 202 или 204 могут быть подключены произвольным количеством средств 206 подключения. Средство 206 подключения может содержать любую локальную сеть (LAN), широкополосную сеть (WAN) или другую компьютерную сеть, включая, но не ограничиваясь ими, Ethernet, корпоративные компьютерные сети, интрасети и Интернет.

Части программного обеспечения и баз данных для хранения данных могут быть реализованы в одной компьютерной системе 202 или 204, с последующим распространением приложения на другие компьютерные системы 202, 204 в распределенной вычислительной среде 200. Части программного обеспечения могут также практически реализовываться в распределенной вычислительной среде 200, в которой задачи выполняются одной компьютерной системой 202 или 204, действующей как удаленное вычислительное устройство, доступ к которому осуществляется через коммуникационную сеть с помощью распределенного приложения, впоследствии распределенным на другие компьютерные системы в распределенной вычислительной среде 200. В сетевой среде программные модули и базы данных для хранения данных могут располагаться на более чем одной компьютерной системе 202 или 204. Коммуникация между компьютерными системами в распределенной вычислительной сети может преимущественно включать в себя шифрование передаваемых данных.

#### Пример

Следующий пример указан таким образом, чтобы обеспечить обычным специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как изготавливать и использовать способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты меры для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения должны учитываться. Если не указано иное, доли представлены массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет около 25°C и давление равно или близко к атмосферному.

#### Пример.

Количественное определение и моделирование атрибутов качества терапевтического моноклонального антитела в фармакокинетических исследованиях на обезьянах с однократным и многократным дозированием.

Этот пример описывает изучение количества PQA терапевтического моноклонального антитела, MAB1, с использованием образцов сыворотки обезьян при ФК исследованиях с однократным и многократным дозированием. С помощью афинной очистки с последующей ЖХ-МС/МС была проведена оценка ряда ПТМ-атрибутов MAB1, включая дезамидирование, окисление, образование N-концевого пироглутамата, удаление C-концевого лизина и гликозилирование с высоким содержанием маннозы. Кроме того, были построены модели для имитации *in vivo* прогрессирования ПТМ и воздействия на субъекта PQA, что обеспечивает количественный подход к оценке критичности PQA. Для оценки моделей было использовано дезамидирование аспарагина в качестве репрезентативного атрибута ПТМ. Воздействие на субъекта дезамидированного MAB1, имитируемое раскрытыми моделями, хорошо согласовалось с экспериментальными результатами исследований как однократного, так и многократного дозирования.

Материалы и методы.

Материалы.

Моноклональное антитело IgG4 человека (MAB1) и антитело против антитела человека, применен-

ное в этом исследовании, получено у Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (г. Тарритаун, штат Нью-Йорк, США). Средний период полувыведения МАВ1 составил приблизительно 11,5 суток. Если не указано иное, все реактивы получены у Sigma-Aldrich (г. Сент-Луис, штат Миссури, США) или Thermo Fisher Scientific (г. Тарритаун, штат Нью-Йорк, США).

Информация об доклинических исследованиях образцов.

Доклинические образцы сыворотки были получены из ФК исследований однократного дозирования или многократного дозирования на яванских макаках. МАВ1 вводили субъектам внутривенно (в/в). Для исследования однократного дозирования животным вводили дозы равные 10 мг/кг, и образцы сыворотки собирали в обозначенные моменты времени (до введения дозы, через 5 мин, 4 ч, 12 ч, 1 сутки, 3 суток, 7 суток, 14 суток, 18 суток, 30 суток, 42 суток и 56 суток) на протяжении курса из 8 недель (56 суток). Для исследования многократного дозирования животным вводили дозы равные 3 мг/кг каждые 2 недели (14 суток), и образцы сыворотки собирали в обозначенные моменты времени (до введения дозы, через 1 ч, 4 ч, 1 сутки, 3 суток, 7 суток) в пределах первого интервала дозирования, а также перед и после каждой новой дозы (14 суток, 28 суток, 42 суток и 56 суток) на протяжении курса из 8 недель (56 суток). До проведения анализов образцы сыворотки хранили при -80°C. Сывороточную концентрацию МАВ1 в каждый момент времени отбора измеряли с использованием твердофазного иммуоферментного анализа (ИФА). Вкратце, МАВ1 захватывалось на планшете для микротитрования, покрытом мишенью-лекарственным средством. Захваченное МАВ1 на планшете выявляли с использованием биотинилированного мышинового моноклонального антитела IgG4 против антитела человека с последующим взаимодействием с NeutrAvidin, конъюгированным с пероксидазой хрена (NeutraAvidin-HRP). Затем был добавлен субстрат на основе люминола, специфичный для пероксидазы, чтобы достичь интенсивности сигнала, пропорциональной концентрации МАВ1.

Аффинная очистка МАВ1 из образцов сыворотки.

МАВ1 очищали из собранных образцов сыворотки обезьяны методом аффинной очистки. Кратко, биотинилированное антитело против антитела человека конъюгировали с магнитными гранулами Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния, США) при комнатной температуре в течение 10 мин. Конъюгированные гранулы инкубировали с образцами сыворотки при комнатной температуре в течение 30 мин. Гранулы промывали буфером HBS-EP (GE Healthcare, г. Питтсбург, штат Пенсильвания, США), а затем элюировали 0,1% муравьиной кислотой и 50% ацетонитрилом. Для оценки степень извлечения МАВ1 во время аффинной очистки использовали (Agilent Technologies, г. Санта-Клара, Калифорния, США). С каждым образцом анализировали известное количество высокомолекулярного стандарта на 230 кДа от Agilent (показан как "верхний маркер") в качестве внутреннего контроля нормализации. Рассчитывали соотношение площади пика МАВ1 к площади пика верхнего маркера в каждом образце для корректирования вариабельности от анализа к анализу. Степень извлечения МАВ1 при аффинной очистке рассчитана с использованием следующего уравнения:

**Уравнение 1:**

Степень извлечения

$$= \frac{\text{Соотношение площадей пиков МАВ1 к верхнему маркеру в «элюате»}}{\text{Соотношение площадей пиков МАВ1 к верхнему маркеру в «поступлении МАВ1»}} \times 100 \%$$

Расщепление трипсином.

Очищенные образцы МАВ1 высушивали с использованием вакуумного концентратора (LAB-CONCO, г. Канзас-Сити, штат Миссури, США). Высушенные образцы повторно суспендировали в 8 М мочеvine и 10 мМ ТСЕР и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Восстановленные остатки цистеина алкилировали 10 мМ йодоацетамидом при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. После алкилирования перед расщеплением концентрацию мочевины разводили до 1,25 М. К образцам добавляли трипсин (Promega, г. Саннивейл, штат Калифорния, США) с соотношением фермент: субстрат 1:10 и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Расщепление останавливали добавлением 20% муравьиной кислоты (FA; Thermo Scientific, г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США). Расщепленные образцы до проведения анализов хранили при -80°C.

ЖХ-МС/МС и анализ данных.

Пептиды, образованные расщеплением трипсина, разделяли с использованием колонки Acquity UPLC CSH C18 1,7 мкм, 2,1 мм × 150 мм (Waters, г. Милфорд, штат Массачусетс, США) на системе Acquity I-Class UPLC (Waters, г. Милфорд, штат Массачусетс, США), соединенной с масс-спектрометром Q Exactive plus (Thermo Fisher Scientific, г. Сан-Хосе, штат Калифорния, США). Подвижной фазой А была 0,1% фторуксусная кислота (FA) в воде и подвижной фазой В была 0,1% FA в ацетонитриле. Для разделения пептидов использовали градиент от 2% подвижной фазы В до 30% подвижной фазы В в течение 56 мин при скорости потока 0,25 мл/мин. Получение данных МС состояло из полного сканирования масс, за которым следовали сканирования tandemных масс (МС/МС) 5 самых интенсивных ионов в каждом полном сканировании. Идентификацию пептидов и ПТМ определяли программой Bruonic (версия

2.16.11, Protein Metrics Inc., г. Сан-Карлос, штат Калифорния, США) и проверяли вручную. Для количественной оценки относительного содержания ПТМ получали хроматограммы выделенных ионов на основе значения  $m/z$  первого изотопного пика как модифицированного пептида, так и нативного пептида, и выделенные площади пиков интегрировали с использованием программы Skyline-daily (версия 4.1.1.18151) с использованием окна масс 5 м.д. Процентное содержание каждого варианта ПТМ рассчитывали с использованием области пика извлеченной ионной хроматограммы (EIC) модифицированного пептида относительно суммы областей пиков модифицированного и нативного пептидов.

Расчет воздействия на субъекта атрибута качества в ФК исследовании однократного дозирования.

Количественная оценка воздействия на субъекта атрибута качества в ФК исследовании однократного дозирования описана ранее Flynn et al. (Goetze et al., mAbs 2010; 2:500-7). Уравнение зависимости сывороточной концентрации MAB1 от времени может быть описано с помощью двухкомпарментной модели (Rowland and Tozer Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins, 2011):

$$\text{Уравнение 2: } C(t) = \text{Доза} \times (C_1 e^{-\lambda_1 t} + C_2 e^{-\lambda_2 t})$$

где  $C(t)$  представляет собой сывороточную концентрацию MAB1;  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$  представляют собой гибридные константы.

С целью упрощения для читабельности, принят следующий формат:

$$\text{Уравнение 3: } C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

где  $A$  и  $B$  представляют собой отрезки при нулевом значении времени (гибридные коэффициенты);  $\alpha$  и  $\beta$  представляют собой гибридные константы первого порядка соответственно. Уравнение аппроксимировано по измеренным ИФА сывороточным концентрациям MAB1 в моменты времени отбора для обнаружения наилучшим образом подходящих параметров. Подбор был ограничен:  $C(0)$  должен быть больше, чем первая сывороточная концентрация MAB1, измеренная с помощью ИФА, после дозирования; константа  $C$  (бесконечная) равна 0;  $A$  и  $B$  должны быть больше 0. Для количественного определения точности подбора использовали значение квадрата  $R$ , и хорошим соответствием считался квадрат  $R$ , превышающий 0,95.

Относительное содержание MAB1 с дезамидированием на сайт-специфическом Asp может описываться кинетическим уравнением первого порядка:

**Уравнение 4:**

$$P_{\text{дезам.}}(t) = 1 - (1 - P_0) \cdot e^{-k_{\text{дезам.}} t}$$

где  $P_{\text{дезам.}}(t)$  представляет собой процентное содержание дезамидирования;  $P_0$  представляет собой исходный уровень дезамидирования на день 0;  $k_{\text{дезам.}}$  представляет собой константу скорости дезамидирования.

Сывороточная концентрация MAB1 с дезамидированием на специфическом сайте Asp может описываться как:

$$\text{Уравнение 5: } C_{\text{дезам.}}(t) = C(t) \cdot P_{\text{дезам.}}(t)$$

где  $C_{\text{дезам.}}(t)$  представляет собой сывороточную концентрацию MAB1 с дезамидированием на специфическом сайте Asp. Площадь под кривой (AUC)  $C_{\text{дезам.}}(t)$  представляет воздействие на субъекта атрибута качества (т.е. MAB1 с дезамидированием на специфическом сайте Asp). Уравнения, описывающие  $C(t)$  и  $P_{\text{дезам.}}(t)$  были решены методом нелинейной регрессии с использованием программы JMP (версия 13.2.1, SAS, г. Кэри, штат Северная Каролина, США).  $C_{\text{дезам.}}(t)$  рассчитано с использованием программы Excel (Microsoft, г. Редмонд, штат Вашингтон, США) и график построен с использованием программы JMP. Воздействие на субъекта, представленное AUC  $C_{\text{дезам.}}(t)$ , рассчитано с использованием программы JMP.

Расчет воздействия на субъекта атрибута качества в ФК исследовании многократного дозирования.

Моделирование воздействия на субъекта атрибута качества в ФК исследовании многократного дозирования было математически упрощено с использованием принципа суперпозиции как линейное накопление множества однократных доз. Сывороточная концентрация MAB1 после каждой дозы описана с помощью двухкомпарментной модели, рассмотренной выше в ФК исследовании однократного дозирования. Сывороточная концентрация MAB1 непосредственно перед  $m^{\text{й}}$  дозой может описываться следующим образом:

$$\text{Уравнение 6: } C_{m, \text{переддоз.}}(m \cdot \tau) = C[(m-1) \cdot \tau] + \dots + C(1 \cdot \tau)$$

где  $m$  представляет собой количество доз и  $\tau$  представляет собой интервал времени между дозами.

Сывороточная концентрация MAB1 непосредственно после  $m^{\text{й}}$  дозы может описываться следующим образом:

$$\text{Уравнение 7: } C_{m, \text{последоз.}}(m \cdot \tau) = C[(m-1) \cdot \tau] + \dots + C(1 \cdot \tau) + C(0)$$

Когда  $m$  приближается к бесконечности,  $C_{m, \text{переддоз.}}$  и  $C_{m, \text{последоз.}}$  достигают равновесных концентраций, описываемых следующим образом:

$$\text{Уравнение 8: } C_{\infty, \text{равновесн., переддоз.}} = \sum_{i=1}^{\infty} (A \cdot e^{-\alpha t_i} + B \cdot e^{-\beta t_i}) = \frac{A}{e^{\alpha\tau} - 1} + \frac{B}{e^{\beta\tau} - 1}$$

$$\text{Уравнение 9: } C_{\infty, \text{равновесн., последоз.}} = \sum_{i=0}^{\infty} (A \cdot e^{-\alpha t_i} + B \cdot e^{-\beta t_i}) = \frac{Ae^{\alpha\tau}}{e^{\alpha\tau} - 1} + \frac{Be^{\beta\tau}}{e^{\beta\tau} - 1}$$

Сывороточная концентрация МАВ1 с дезамидированием на специфическом сайте Asp непосредственно перед  $m$ -й дозой может описываться следующим образом:

$$\text{Уравнение 10: } C_{\text{дезам., } m, \text{ переддоз.}}(m \cdot \tau) = P_{\text{дезам.}}[(m-1) \cdot \tau] C[(m-1) \cdot \tau] + \dots + P_{\text{дезам.}}(1 \cdot \tau) C(1 \cdot \tau)$$

Сывороточная концентрация МАВ1 с дезамидированием на специфическом сайте Asp непосредственно после  $m$ -й дозы может описываться следующим образом:

$$\text{Уравнение 11: } C_{\text{дезам., } m, \text{ последоз.}}(m \cdot \tau) = P_{\text{дезам.}}[(m-1) \cdot \tau] C[(m-1) \cdot \tau] + \dots + P_{\text{дезам.}}(1 \cdot \tau) C(1 \cdot \tau) + P_{\text{дезам.}}(0) C(0)$$

где  $P_{\text{дезам.}}(t)$  представляет собой уравнение реакции первого порядка, обсуждаемое выше в ФК исследовании однократного дозирования.

Таким образом, относительное содержание МАВ1 с дезамидированием на специфическом сайте Asp непосредственно перед  $m$ -й дозой может описываться следующим образом:

$$\text{Уравнение 12: } P_{\text{дезам., } m, \text{ переддоз.}}(m \cdot \tau) = \frac{C_{\text{дезам., } m, \text{ переддоз.}}(m \cdot \tau)}{C_{m, \text{ переддоз.}}(m \cdot \tau)}$$

Таким образом, относительное содержание МАВ1 с дезамидированием на специфическом сайте Asp непосредственно после  $m$ -й дозы может описываться следующим образом:

$$\text{Уравнение 13: } P_{\text{дезам., } m, \text{ последоз.}}(m \cdot \tau) = \frac{C_{\text{дезам., } m, \text{ последоз.}}(m \cdot \tau)}{C_{m, \text{ последоз.}}(m \cdot \tau)}$$

Когда  $m$  приближается к бесконечности,  $P_{\text{дезам., } m, \text{ переддоз.}}$  и  $P_{\text{дезам., } m, \text{ последоз.}}$  достигают равновесных уровней, описываемых следующим образом:

**Уравнение 14:**

$$P_{\text{дезам., } \infty, \text{ равновесн., переддоз.}} = \frac{I}{C_{\infty, \text{ переддоз.}}} \sum_{i=1}^{\infty} P_{\text{дезам.}}(i) \cdot C(i) = \frac{I}{C_{\infty, \text{ переддоз.}}} \sum_{i=1}^{\infty} [1 - (1 - P_0)e^{-k\tau i}] (A \cdot e^{-\alpha t_i} + B \cdot e^{-\beta t_i})$$

$$\text{Уравнение 15: } P_{\text{дезам., } \infty, \text{ равновесн., последоз.}} = \frac{P_{\text{дезам., } \infty, \text{ переддоз.}} \cdot C_{\infty, \text{ переддоз.}} + P_{\text{дезам.}}(0) \cdot C(0)}{C_{\infty, \text{ последоз.}}}$$

Так как при расчете условия суммирования сходятся, то уровни дезамидирования перед дозированием в равновесном состоянии можно упростить следующим образом:

**Уравнение 16:**

$$P_{\text{дезам., } \infty, \text{ равновесн., переддоз.}} = \frac{A \left( \frac{1}{e^{\alpha\tau} - 1} - \frac{1 - P_0}{e^{(\alpha+k)\tau} - 1} \right) + B \left( \frac{1}{e^{\alpha\tau} - 1} - \frac{1 - P_0}{e^{(\beta+k)\tau} - 1} \right)}{\frac{A}{e^{\alpha\tau} - 1} + \frac{B}{e^{\beta\tau} - 1}}$$

Следовательно уровень дезамидирования после дозирования в равновесном состоянии можно упростить следующим образом:

**Уравнение 17:**

$$P_{\text{дезам., } \infty, \text{ равновесн., последоз.}} = \frac{\left[ A \left( \frac{1}{e^{\alpha\tau} - 1} - \frac{1 - P_0}{e^{(\alpha+k)\tau} - 1} \right) + B \left( \frac{1}{e^{\beta\tau} - 1} - \frac{1 - P_0}{e^{(\beta+k)\tau} - 1} \right) \right] + P_0(A+B)}{\frac{Ae^{\alpha\tau}}{e^{\alpha\tau} - 1} + \frac{Be^{\beta\tau}}{e^{\beta\tau} - 1}}$$

Константы  $A$ ,  $B$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $k$  уравнения были определены аппроксимацией уравнения по экспериментальным результатам, полученным в пределах первого интервала дозирования. Имитированные и прогнозируемые значения рассчитаны с использованием программы Excel, а затем построены графики с использованием JMP. Воздействие на субъекта (т.е. AUC), рассчитано с использованием программы JMP.

Результаты.

Количество посттрансляционных модификаций МАВ1 in vivo.

Динамика in vivo вариантов МАВ1 с различными ПТМ оценивали на обезьянах в ФК исследованиях как однократного, так и многократного дозирования.

Использовали биотинилированное антитело против Fc человека, конъюгированное на магнитных гранулах со стрептавидином для выделения МАВ1 из образцов сыворотки обезьян. Степень извлечения

при афинной очистке MAB1 составила >99,5% (фиг. 1), что показало, что подход афинной очистки может полностью извлекать как нативный MAB1, так и его ПТМ-варианты, обеспечивая точную количественную оценку относительного содержания ПТМ каждого ПТМ.

На фиг. 2А показан пример тандемных MS-спектров идентификации Fc-пептида дикого типа после расщепления трипсином DTLMISR (SEQ ID NO: 1) (нижняя панель) и соответствующего пептида с окисленным метионином (Met) (верхняя панель). На фиг. 2В показаны области пиков хроматограмм извлеченных ионов пептида дикого типа (нижняя панель) и соответствующего пептида с окисленным Met (верхняя панель).

Дезамидирование аспарагина (Asn) является распространенным ПТМ в области высококонсервативных кристаллизующихся фрагментов (Fc) mAb (Chelius et al., *Analytical Chemistry* 2005; 77:6004-11; Sinha et al., *Protein Science: a publication of the Protein Society* 2009; 18:1573-84). В этом исследовании отслеживали три общих сайта дезамидирования NG (сайт Asn 1) в домене CH2, NG (сайт Asn 2) и NN (сайт Asn 3) в пептиде PENNY домена CH3. В этой работе отслеживали три сайта дезамидирования Asn, NG (сайт Asn 1) в CH2 домена, NG (сайт Asn 2) и NN (сайт Asn 3) в домене CH3. В ФК исследование однократного дозирования относительное содержание дезамидирования сайта Asn 1 осталось почти неизменным на низком уровне ~0,2% на протяжении 56 суток (фиг. 3А). Относительное содержание дезамидирования сайта Asn 2 и сайта Asn 3 увеличилось от ~1% до 25,5% и 9,1% на протяжении 56 суток, соответственно (фиг. 3А). Скорость дезамидирования зависит от первичной аминокислотной последовательности, белковой структуры, pH, температуры и состава буфера (Chelius et al., *Analytical Chemistry* 2005; 77:6004-11; Sinha et al., *Protein Science: a publication of the Protein Society* 2009; 18:1573-84; Kossiakoff, *Science* 1988; 240:191-4; Athmer et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:30502-7; Xie et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1999; 88:8-13; Wearne et al., *Proteins* 1989; 5:8-12; Capasso et al., *The Journal of Peptide Research: official journal of the American Peptide Society* 1999; 54:377-82; Song Y et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 90:141-56; Wakankar et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 95:2321-36; Zheng et al., *International Journal of Pharmaceutics* 2006; 308:46-51; Pace et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 102:1712-23). Остаток Asn, за которым следует глицин (Gly) или серин (Ser) в пределах первичной аминокислотной последовательности, особенно восприимчив к дезамидированию (Patel et al., *Pharmaceutical Research* 1990; 7:787-93; Stephenson et al., *The Journal of Biological Chemistry* 1989; 264:6164-70; et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98:944-9; Robinson et al., *The Journal of Peptide Research: official journal of the American Peptide Society* 2004; 63:426-36). Сайты NG и NN полностью открыты воздействию растворителя и поэтому более чувствительны к дезамидированию (DeLano et al., *Science* 2000; 287:1279-83) than the "NG" site in the CH2 domain (DeLano et al., *Science* 2000; 287:1279-83).

Скорость дезамидирования может описываться с использованием уравнения скорости первого порядка, как было установлено ранее (Geiger et al., *The Journal of Biological Chemistry* 1987; 262:785-94). Уравнение скорости можно выразить в виде  $P_{\text{ПТМ}}(t) = 1 - (1 - P_0) \cdot e^{-k_{\text{ПТМ}}t}$ , где  $P_{\text{дезам.}}(t)$ , как описано в разделе "Материалы и методы", представляет собой долю дезамидирования в виде функции времени;  $P_0$  представляет собой исходный уровень дезамидирования;  $k_{\text{дезам.}}$  представляет собой константу скорости дезамидирования. Уравнение было нелинейно подобрано по измеренным ЖХ-МС уровням дезамидирования в исследовании однократного дозирования для определения наиболее подходящих параметров (фиг. 3А и табл. 1). Константы скорости дезамидирования *in vivo* сайтов Asn 1, 2 и 3 нелинейно аппроксимированы как равные 0,003278% сутки<sup>-1</sup>, 0,5384% сутки<sup>-1</sup> и 0,1566% сутки<sup>-1</sup>, соответственно с R равным 0,9946, 0,9866 и 0,8941 соответственно (табл. 1).

Таблица 1

Значения наилучших подобранных параметров в уравнениях скорости модификации из ФК исследования однократного дозирования

Сайт дезамидирования	$P_0$ (%)	$k_{\text{дезам.}}$ (сутки <sup>-1</sup> )	Стандартная ошибка подобранного $P_0$		Стандартная ошибка подобранной $k_{\text{дезам.}}$	$R^2$
Сайт Asn 1	0,1918	0,003523%	0,00971		4,044e-006	0,8941
Сайт Asn 2	1,143	0,5394%	0,2758		0,0001361	0,9946
Сайт Asn 3	0,8848	0,1546%	0,1389		6,09e-005	0,9866
N-концевой пироглутамат	0,6868	0,2201%	0,1169	5,22e-005	0,9970	

Где  $P_0$  представляет собой исходный уровень дезамидирования на сутки 0;  $k_{\text{дезам.}}$  представляет собой константу скорости дезамидирования.

В исследовании многократного дозирования дезамидирование сайта Asn 1 осталось почти неизменным на низком уровне ~0,5% после 5 введений доз раз в две недели на протяжении 56 суток (фиг. 3В). Относительное содержание дезамидирования на сайтах Asn 2 и 3 накапливалось в каждом интервале дозирования, но резко снижалась после каждой новой дозы из-за разбавления нововведенным недезамидированным МАВ1 (фиг. 3В). Уровни дезамидирования до и после получения дозы постепенно увеличивались после получения каждой дозы в результате накопления дезамидированной МАВ1. Уровень дезамидирования на сайте Asn 2 до получения дозы перед 5<sup>-й</sup> дозой на 56-й сутки увеличился до 14,2%, в то время как уровень после приема дозы достиг 7,9% (фиг. 3В). Уровень дезамидирования на сайте Asn 3 до получения дозы перед 5<sup>-й</sup> дозой на 56-й сутки увеличился до 6,2%, в то время как уровень после приема дозы достиг 3,6% (фиг. 3В). В результате, относительное содержание дезамидирования на сайтах Asn 2 и 3 проявила шаблон "зубьев пилы" с тенденцией к возрастанию с течением времени (фиг. 3В). На фиг. 3В также показано, что как до, так и после получения доз уровни дезамидирования будут приближаться к равновесному после получения конечного числа доз. Для прогнозирования равновесных уровней дезамидирования была построена 2-компарментная модель для концентраций МАВ1, которая будет обсуждаться ниже в разделах, посвященных моделированию. Окисление Met представляет собой другую распространенную ПТМ в mAb (Yin et al., *Pharmaceutical research* 2013; 30:167-78; Li et al., *mAbs* 2016:0; Li et al., *mAbs* 2016:0; Liu et al., *The Journal of biological chemistry* 2011; 286:11211-718). Показано, что окисление Met в Fc-области влияет на связывание Fc-рецептора (Pan et al., *Protein Science: a publication of the Protein Society* 2009; 18:424-33). В данной работе оценивали три распространенные сайты окисления Met в Fc-области, сайт Met 1 в домене CH2, а также сайты Met 2 и 3 в домене CH3. В исследовании однократного дозирования относительное содержание окисления на сайтах Met 1, 2 и 3 на протяжении 56 суток оставалось относительно неизменным на уровне ~8,0%, ~2,0% и ~5,0% соответственно (фиг. 4А). В исследовании множественных доз уровень окисления сайта Met 1 слегка уменьшался во время каждого интервала дозирования и слегка увеличивался после каждой дозы, демонстрируя шаблон "зубьев пилы", который колебался в пределах ~7,0% и ~9,0%. Уровни окисления на сайтах Met 2 и 3 оставались стабильными на уровне ~1,0% и 4,0%, соответственно, в исследовании многократного дозирования (фиг. 4В).

N-концевой глутамин и глутамат на N-концах mAb склонны образовывать пироглутамат посредством химической или ферментативной циклизации. Превращение глутамина происходит гораздо быстрее, чем глутамата (Yin et al., *Pharmaceutical research* 2013; 30:167-78; Li et al., *mAbs* 2016:0; Li et al., *mAbs* 2016:0; Liu et al., *The Journal of biological chemistry* 2011; 286:11211-718). Циклизированный N-концевой белок является устойчивым к расщеплению аминопептидазами, что предотвращает его деградацию. Хотя глутаминилциклаза, фермент, катализирующий это превращение, находится в человеческой крови (Schilling et al., *Biological Chemistry* 2008; 389:983-91), образование пироглутамата из глутамата mAb in vivo преимущественно является рН-зависимой неферментной реакцией, поскольку она имеет такую же константу скорости в фосфатно-солевом буфере FcB in vitro (Yin et al., *Pharmaceutical Research* 2013; 30:167-78; Liu et al., *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286:11211-7). В исследовании однократного дозирования N-концевой пироглутамат увеличился от 0,7% до 11,7% на протяжении 56 суток (фиг. 5А). Ско-

рость образования N-концевого пироглутамата *in vivo* определили равной  $0,2201\%$  сутки<sup>-1</sup> с  $R^2$  0,9970 с использованием нелинейной аппроксимации измеренного ЖХ-МС уровня N-концевого пироглутамата. В исследовании многократного дозирования образование N-концевого пироглутамата напоминало шаблон "зубьев пилы" сходный для дезамидирования Asn (фиг. 5B). Уровень пироглутамата увеличивался в течение каждого интервала дозирования, но резко снижался после каждой новой дозы в результате разбавления нововведенным немодифицированным МАВ1. Перед 5-й дозой на 56-й день уровень пироглутамата повысился до 7,6%, а затем упал до 4,2% после 5-й дозы (фиг. 5B).

C-концевой остаток лизина тяжелой цепи mAb чувствительный к удалению основной карбоксипептидазой во время экспрессии белка (Dick et al., *Biotechnology and Bioengineering* 2008; 100:1132-43). Частичное удаление C-концевого лизина приводит к неоднородности заряда. Процентное содержание лекарственного препарата МАВ1, содержащего C-концевой лизин до введения составляла ~2,0%. В обоих исследованиях однократного и многократного дозирования C-концевой лизин быстро удалялся в пределах одних суток после каждой дозы (фиг. 6). Эти наблюдения согласуются с результатами исследования, о котором сообщалось ранее.

N-связанное гликозилирование в Fc-области является обычно наблюдаемым PQA mAb. Преобладающие структуры N-связанных гликоформ на экспрессированных на клетках яичника китайского хомячка (СНО) mAb, как правило, состоят из ядра биантеннарной пентасакхаридной структуры с одним или более дополнительными моносахаридами, прикрепленными к ней. В дополнение к сложным биантеннарным олигосахаридным структурам на СНО-экспрессированных антителах также могут наблюдать гликоформы с высоким содержанием маннозы (например, варианта маннозы 5). В исследовании однократного дозирования относительные содержания основных гликоформ (фукозилированных сложных биантеннарных) оставались неизменной на протяжении 56 суток. Однако относительное содержание гликоформы маннозы 5 снизилась с 0,5% до необнаруживаемого в течение 6 недель (фиг. 6A). Этот вывод согласуется с более быстрым выведением из сыворотки гликоформ с высоким содержанием маннозы за счет пути выведения, опосредованного высокоманнозным рецептором (Goetze et al., *Glycobiology* 2011; 21:949-59; Alessandri et al., *mAbs* 2012; 4:509-20). В исследовании многократного дозирования уровень варианта маннозы 5 уменьшался в течение каждого интервала дозирования и оценивался непосредственно после каждой новой дозы вследствие смешивания с нововведенным МАВ1 с более высоким уровнем варианта маннозы 5, проявляя шаблон "зубьев пилы" (фиг. 6B). До введения 5<sup>-й</sup> дозы уровень варианта маннозы 5 снизился до 0,1%. После введения 5<sup>-й</sup> дозы уровень варианта маннозы 5 увеличился до 0,4%.

Моделирование воздействия на субъекта PQA МАВ1 в исследовании однократного дозирования.

Количественная оценка воздействия на субъекта атрибутов качества mAb помогает оценивать влияние атрибутов качества на безопасность и эффективность лекарственного средства. Сывороточную концентрацию *in vivo* mAb с определенной ПТМ можно описывать как  $C_{ПТМ}(t)=C(t) \cdot P(t)$ , как описано в разделе "Материалы и методы". Площадь под кривой (AUC)  $C_{ПТМ}(t)$  представляет воздействие на субъекта mAb с ПТМ (Goetze et al., *mAbs* 2010; 2:500-7). В данной работе в качестве примеров для демонстрации моделирования воздействия на субъекта PQA в исследовании однократного дозирования было использовано дезамидирование на сайтах Asn 2 и 3, а также образование N-концевого пироглутамата. Моделирование не проводилось для других ПТМ, обсуждаемых в данной работе, так как окисление Met не изменялось *in vivo* (фиг. 4); C-концевой лизин быстро удался в течение нескольких часов после введения (фиг. 6); уровни варианта маннозы 5 и дезамидирования на сайте Asn 1 были крайне низкими (менее 0,5%, фиг. 3 и фиг. 7), что делает моделирование этих ПТМ практически нецелесообразным.

Профиль сывороточной концентрации МАВ1 в зависимости от времени описывали уравнением двухкомпарментной фармакокинетической модели в виде  $C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ , где A и B представляют собой гибридные коэффициенты при условии, что  $\alpha$  и  $\beta$  представляют собой гибридные константы первого порядка соответственно. Экспериментальные сывороточные концентрации МАВ1, полученные в ФК исследовании однократного дозирования, были определены с использованием анализа ИФА. Уравнение моделирования было решено нелинейной аппроксимацией к измеренным ИФА сывороточным концентрациям МАВ1 с  $R$  0,9916 (фиг. 8A). Наилучшие подобранные значения параметров в уравнении моделирования приведены в табл. 2. Воздействие на субъекта МАВ1 на протяжении 56 суток, представленное AUC  $C(t)$ , составило 4302,0 мкг/мл сутки (фиг. 8A).

Уравнение скорости дезамидирования на сайте Asn 2 определено в предыдущем разделе выше как  $P_{\text{дезам.-Asn2}}(t) = 1 - (1 - 0,01143) \cdot e^{-0,005394t}$ . Уравнение сывороточной концентрации от времени для МАВ1 с дезамидированием на сайте Asn 2,  $C_{\text{дезам.-Asn2}}(t) = C(t) \cdot P_{\text{дезам.-Asn2}}(t)$ , следовательно может решаться умножением  $C(t)$  и  $P_{\text{дезам.-Asn2}}(t)$ . Кривая  $C_{\text{дезам.-Asn2}}(t)$  построена на фиг. 8B. Воздействие на субъекта МАВ1 с дезамидированием на сайте Asn 2 на протяжении 56 суток, представленное AUC  $C_{\text{дезам.}}(t)$ , рассчитано равным 426,7 мкг/мл сутки (фиг. 8B), составляя 9,9% воздействия на субъекта общего содержания МАВ1 на протяжении 56 суток.

Сходным образом уравнение скорости дезамидирования на сайте Asn 3 определено в предыдущем разделе выше как  $P_{\text{дезам.-Asn3}}(t) = 1 - (1 - 0,008848) \cdot e^{-0,001546t}$ . Уравнение сывороточной концентрации от вре-

мени для МАВ1 с дезамидированием на сайте Asn 3,  $C_{\text{дезам.-Asn3}}(t) = C(t) \cdot P_{\text{дезам.-Asn3}}(t)$ , следовательно может решаться умножением  $C(t)$  и  $P_{\text{дезам.-Asn3}}(t)$ . Кривая  $C_{\text{дезам.-Asn3}}(t)$  построена на фиг. 8В. Воздействие на субъекта МАВ1 с дезамидированием на сайте Asn 3 на протяжении 56 суток, представленное AUC  $C_{\text{дезам.-Asn3}}(t)$ , рассчитано равным 152,5 мкг/мл сутки (фиг. 8В), составляя 3,5% воздействия на субъекта общего содержания МАВ1 на протяжении 56 суток.

Уравнение скорости образования N-концевого пироглутамата определено в предыдущем разделе выше как  $P_{\text{PyroE}}(t) = 1 - (1 - 0,006868) \cdot e^{-0,002201t}$ . Уравнение сывороточной концентрации от времени для МАВ1 с N-концевым пироглутаматом,  $C_{\text{PyroE}}(t) = C(t) \cdot P_{\text{PyroE}}(t)$ , следовательно может решаться умножением  $C(t)$  и  $P_{\text{PyroE}}(t)$ . Кривая  $C_{\text{PyroE}}(t)$  построена на фиг. 8В. Воздействие на субъекта МАВ1 с N-концевым пироглутаматом на протяжении 56 суток, представленное AUC  $C_{\text{PyroE}}(t)$ , составило 191,5 мкг/мл сутки (фиг. 8В), составляя 4,5% воздействие на субъекта общего содержания МАВ1 на протяжении 56 суток.

Таблица 2

Значения наилучших подобранных параметров в уравнениях сывороточной концентрации МАВ1 от времени из ФК исследования однократного дозирования и первого интервала дозы ФК исследования многократного дозирования

Исследование	Исследование однократного дозирования	Первая доза исследования многократного дозирования
A	139,0925	57,8676
B	180,8075	25,3133
$\alpha$	1,1227	0,0413
$\beta$	0,0389	0,9286
Стандартная ошибка подобранного A	15,4245	9,9061
Стандартная ошибка подобранного B	17,3316	9,7499
Стандартная ошибка подобранной $\alpha$	0,3262	0,0185
Стандартная ошибка подобранной $\beta$	0,0058	0,7592
R <sup>2</sup>	0,9916	0,9818

Моделирование воздействия на субъекта PQA МАВ1 в исследовании многократного дозирования.

Для любого заданного интервала времени с использованием области под кривыми зависимости концентрации от времени можно рассчитывать воздействие на субъекта как общего содержания МАВ1, так и обладающего определенным атрибутом МАВ1 (например, с дезамидированием Asn). AUC прогнозированной и экспериментальной кривых общей сывороточной концентрации МАВ1 от времени представляют воздействие на субъекта общего содержания МАВ1 на протяжении определенного интервала времени. На основании прогнозированной и экспериментальной кривых общей сывороточной концентрации МАВ1 от времени (фиг. 9А), прогнозируемое и экспериментально определенное воздействие на субъекта общего содержания МАВ1 на протяжении курса из 5 доз (56 суток) составило 5013 мкг/мл сутки и 4789 мкг/мл сутки, соответственно. Разница между прогнозированными и экспериментальными значениями составляет 4,7%. Сходным образом, AUC прогнозированной и экспериментально определенной кривых МАВ1 с дезамидированием на сайте Asn 2 представляют воздействие на субъекта МАВ1 с дезамидированием на сайте Asn 2 на протяжении определенного интервала времени. Прогнозируемое и экспериментально определенное воздействие на субъекта МАВ1 с дезамидированием на сайте Asn 2 на протяжении курса из 5 доз (56 суток) составило 381,5 мкг/мл сутки и 352,6 мкг/мл сутки, соответственно (фиг. 9А). Прогнозируемое и экспериментально определенное воздействие на субъекта МАВ1, дезамидированного на сайте Asn 2, в виде доли воздействия на субъекта общего содержания МАВ1, на протяжении 56 суток составило 7,0% и 7,9%, соответственно, демонстрируя то, что модели точно предсказывают экспериментальные результаты.

Прогнозируемое и экспериментально определенное воздействие на субъекта МАВ1, дезамидированного на сайте Asn 3, на протяжении курса из 5 доз (56 суток) составило 172,8 мкг/мл сутки и 158,8 мкг/мл сутки, соответственно (фиг. 9А). Прогнозируемое и экспериментально определенное воздействие на субъекта МАВ1, дезамидированного на сайте Asn 3, в виде доли воздействия на субъекта общего содержания МАВ1, на промежутке из 56 суток составило 3,4% и 3,3%, соответственно.

Прогнозируемое и экспериментально определенное воздействие на субъекта МАВ1 с N-концевым пироглутаматом на протяжении курса из 5 доз (56 суток) составило 218,5 мкг/мл сутки и 231,8 мкг/мл сутки, соответственно (фиг. 10А). Прогнозируемое и экспериментально определенное воздействие на субъекта МАВ1 с N-концевым пироглутаматом, в виде доли воздействия на субъекта общего содержания МАВ1, на промежутке из 56 суток составило 4,3% и 4,8%, соответственно.

Моделирование относительный содержаний *in vivo* PQA MAB1 в исследовании многократного дозирования

Модели также могут быть использованы для прогнозирования уровней PQA mAb до и после получения доз при любой заданной дозе во время исследования многократного дозирования, используя уравнение 12 и уравнение 13, соответственно.

Например, прогнозируемые уровни дезамидирования на сайте Asn 2 до и после получения доз на сутки 56 составляют 14,2% и 7,9%, соответственно. На сутки 56 прогнозируемые значения соответствуют определенным ЖХ/МС значениям до и после получения доз, они составили 15,0% и 7,9% соответственно. Все остальные прогнозируемые уровни дезамидирования (фиг. 9В, незакрашенные круги) хорошо согласуются с экспериментальными измерениями (фиг. 9В, закрашенные круги). Уровни ПТМ до и после получения доз в исследовании многократного дозирования достигнут равновесного состояния, как только сывороточные концентрации mAb до и после получения доз достигнут равновесных концентраций (фиг. 9В). Прогнозируемые равновесные уровни PQA до и после получения доз (т.е. уровни плато) соответствуют максимальному и минимальному уровням этого PQA *in vivo* в исследовании многократного дозирования. С использованием уравнения 16 и уравнения 17, равновесные уровни MAB1 с дезамидированием на сайте Asn 2 до и после получения доз определили равными 17,9% и 9,7% соответственно.

Сходным образом, прогнозируемые уровни дезамидирования сайта Asn 3 (фиг. 9В, незакрашенные треугольники) до и после получения доз хорошо согласуются с экспериментальными измерениями (фиг. 9В, закрашенные треугольники). Равновесные уровни MAB1 с дезамидированием на сайте Asn 3 до и после получения доз определили равными 8,4% и 4,6%, соответственно.

Прогнозируемые уровни N-концевого пироглутамата (фиг. 10В, незакрашенные круги) до и после получения доз хорошо согласуются с экспериментальными измерениями (фиг. 10В, закрашенные круги). Равновесные уровни MAB1 с N-концевым пироглутаматом до и после получения доз определили равными 8,1% и 4,5%, соответственно.

Примеры применения моделей.

Количественная оценка PQA терапевтического белка *in vivo* важна, поскольку она помогает выявить потенциальные критические атрибуты качества (CQA), которые в противном случае не были бы выявлены *in vitro*, влияя, таким образом, на стратегию оценки и контроля рисков, связанных с продуктом. Модели, описанные в данном документе, могут быть использованы для количественной оценки PQA во многих применениях. Во-первых, с использованием этих моделей можно рассчитывать прогрессирование PQA *in vivo* и воздействие на субъекта PQA в схемах однократного и многократного дозирования. Хорошие согласования между модельными прогнозами и экспериментальными измерениями продемонстрированы в разделах выше (фиг. 8, 9 и 10). Во-вторых, модели могут использоваться для прогнозирования воздействия на субъекта путем продления периода дозирования ( $t$ ) и определения равновесных концентраций/уровней PQA до и после получения доз (фиг. 9 и 10), что дает представление о доклинических и клинических исследованиях. В-третьих, модели можно использовать для оценки влияния изменений исходных уровней PQA, возникающих в результате изменения технологического процесса или вариативности от серии к серии, путем корректирования исходных уровней PQA ( $P_0$ ) в уравнениях моделирования. Это особенно важно, если PQA является модификацией CDR. Поскольку MAB1, использованное в данной работе, не имеет модификации CDR, подходящей для этого применения моделирования, в качестве примера использования моделей для оценки влияния исходных уровней дезамидирования CDR на воздействие на субъекта PQA использовано гипотетическое дезамидирование CDR со скоростью дезамидирования *in vivo* равной 2,5% в сутки<sup>-1</sup>. При наличии трех партий лекарственных средств исходные уровни гипотетического дезамидирования CDR составили 0%, 10% и 20% соответственно. Гипотетическое дезамидирование CDR *in vivo* этих партий с течением времени может описываться как  $P_{\text{дезам.}}(t) = 1 - (1 - 0) \cdot e^{-0,025t}$ ,  $P_{\text{дезам.}}(t) = 1 - (1 - 0,1) \cdot e^{-0,025t}$  и  $P_{\text{дезам.}}(t) = 1 - (1 - 0,2) \cdot e^{-0,025t}$  соответственно. Используя описанные выше модели, воздействие на субъекта гипотетических CDR-дезамидированных вариантов с 0%, 10% и 20% исходным дезамидированием на протяжении 56 суток в исследовании однократного дозирования составляет 1385 мкг/мл сутки, 1653 мкг/мл сутки и 1921 мкг/мл сутки, соответственно составляя 32,5%, 38,8% и 45,1% воздействия на субъекта общего содержания mAb, соответственно (фиг. 11А). Для исследования многократного дозирования воздействие на субъекта гипотетических CDR-дезамидированных вариантов с 0%, 10% и 20% исходным дезамидированием на протяжении 5 доз (56 суток) составляет 1086 мкг/мл сутки, 1478 мкг/мл сутки и 1871 мкг/мл сутки, соответственно составляя 21,7%, 29,5% и 37,3% воздействия на субъекта общего содержания mAb, соответственно (фиг. 11В). Таким образом, если управление технологическим процессом привело к содержанию  $\pm 10\%$  исходных уровней этого гипотетического CDR-дезамидирования, то воздействие на субъекта этого CDR-дезамидированного mAb варьирует в пределах около 6-8% в исследованиях однократного и многократного дозирования на протяжении 56 суток. Поскольку моделирование демонстрирует, что воздействие на субъекта этого гипотетического CDR-дезамидирования нечувствительно к исходному уровню PQA, допустимые диапазоны PQA могут быть расширены, чтобы дать возможность уточнить оценку риска для технологического процесса. В сочетании с влиянием модификации CDR на активность, измеренную с

помощью анализа активности, результаты моделирования могут использоваться для оценки воздействия на субъекта эффективного лекарственного средства в тех случаях, когда исходные модификации CDR являются результатом технологических управляющих воздействий или варьирования от серии к серии, что дает очень важную информацию для оценки риска, связанного с продуктом.

Обсуждение результатов.

Динамическое окружение *in vivo* циркулирующего кровотока, приводящее в результате к выведению, удалению и деструкции mAb, намного больше связано с оцениваемыми изменениями PQA в организме пациентов, по сравнению со статическим инкубированием mAb в ФСБ или сыворотке *in vitro* (Yin et al., *Pharmaceutical research* 2013; 30:167-78). Таким образом, количественное определение и моделирование PQA *in vivo* предоставляет очень важную информацию, которую нельзя получить в исследованиях *in vitro*, для оценки критичности PQA. Например, эти результаты, представленные в данном документе (фиг. 6) и предыдущих исследованиях (Li et al., mAbs 2016:0; Cai et al., *Biotechnology and Bioengineering* 2011; 108:404-12), показали, что С-концевой лизин *in vivo* быстро удаляется в пределах одних суток. Сходным образом, было показано, что трисульфидные связи быстро превращаются в дисульфидные связи *in vivo* (Li et al., mAbs 2016:0). Результаты, представленные в данном документе (фиг. 4) и предыдущих исследованиях (Li et al., mAbs 2016:0; Li et al., mAbs 2016:0), продемонстрировали, что уровни окисления метионина часто остаются неизменными после введения *in vivo*. Следовательно, удаление С-концевого лизина, трисульфидная связь и окисление метионина являются меньше значимыми, чтобы считаться CQA. В отличие от этого, было показано, что дезамидирование накапливается *in vivo* в схемах однократного и многократного дозирования (фиг. 3) и в предыдущих исследованиях (Li et al., mAbs 2016:0; Li et al., mAbs 2016:0). Дезамидирование, которое происходит и накапливается в области CDR, может потенциально влиять на эффективность лекарственных средств (Yan et al., *Journal of pharmaceutical sciences* 2009; 98:3509-21; Habegger et al., mAbs 2014; 6:327-39) или приводить к нецелевому связыванию. Таким образом, моделирование дезамидирования CDR *in vivo* с использованием уравнений, описанных в данном документе, может количественно оценивать влияние дезамидирования CDR на воздействие на субъекта, как показано выше (фиг. 11).

В данной работе для демонстрации обоснованности наших моделей в качестве репрезентативных ПТМ были использованы дезамидирование аспарагина и образование N-концевого пироглутамата. Наши модели также могут применяться и к другим ПТМ, которые демонстрируют тенденцию к увеличению или уменьшению содержания. Например, были применены модели для оценки выведения варианта маннозы 5 путем принятия кинетики третьего порядка вследствие ферментативно обусловленного клиренса варианта маннозы 5. Прогнозируемые значения хорошо совпали с экспериментальными данными, даже несмотря на то, что относительное содержание варианта маннозы 5 снизилось до менее 1,0% с течением времени (данные не показаны). Наши модели могут использоваться для вычисления других параметров для оценки заданного атрибута или ПТМ в исследовании множественных доз. Эти параметры включают скорость накопления до равновесного состояния, средний уровень при равновесном состоянии и степень варибельности ПТМ при равновесном состоянии.

В целом, изобретатели охарактеризовали общие изменения ПТМ *in vivo* терапевтического mAb (MAb1), а также смоделировали поведение ПТМ *in vivo* как для схем исследований однократного, так и многократного дозирования, для оценки влияния ПТМ *in vivo*. Три остатка аспарагина, расположенные в Fc-области MAb1, проявили различные скорости дезамидирования. Уровни окисления трех остатков метионина в Fc-области MAb1, показали отсутствие изменений с течением времени *in vivo*. N-концевой пироглутамат быстро образовывался *in vivo*. С-концевой лизин полностью удалялся в пределах одного дня. MAb1, содержащий гликозилирование с высоким содержанием маннозы, проявило ускоренное выведение. Авторы использовали два дезамидирования Asn и образование N-концевого пироглутамата как репрезентативные PQA и построили уравнения моделирования для расчета сывороточной концентрации PQA, воздействие на субъекта PQA, и относительного содержания PQA *in vivo* в схемах как однократного, так и многократного дозирования. Прогнозы модели были подтверждены экспериментальными измерениями. Таким образом, модели могут использоваться для имитации *in vivo* прогрессирования PQA воздействия на субъекта PQA в схемах как однократного, так и многократного дозирования, обеспечивая количественные подходы для критичной оценки PQA в терапевтических mAb.

Настоящее изобретение не должно ограничиваться по объему конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данном документе, станут очевидны специалистам в данной области техники из приведенного выше описания и сопроводительных фигур. Такие модификации предназначены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения критичности атрибута качества продукта (PQA) антитела после многократных введений антитела субъекту, включающий

(а) прогнозирование концентрации *in vivo* в сыворотке антитела с PQA после однократного введе-

ния антитела путем

(i) прогнозирования процентного содержания антитела с PQA с использованием константы скорости *in vivo*, определенной для PQA; и

(ii) умножения прогнозируемого процентного содержания антитела с PQA на общую концентрацию антитела *in vivo* для определения концентрации антитела с PQA с получением, таким образом, модели однократного введения;

(b) повторение стадии (a) по меньшей мере один раз и, таким образом, создание одной или более дополнительных моделей однократного введения;

(c) наложение моделей однократного введения на стадиях (a) и (b) и, таким образом, создание модели многократного введения; и

(d) использование модели многократного введения для определения критичности PQA, причем PQA включает представляющую интерес посттрансляционную модификацию.

2. Способ по п.1, в котором константу скорости *in vivo* для посттрансляционной модификации определяют количественным определением процентного содержания представляющей интерес посттрансляционной модификации в виде функции времени и подбором количественного процентного содержания представляющей интерес посттрансляционной модификации по данному уравнению:  $P_{\text{ПТМ}}(t) = 1 - (1 - P_0) \cdot e^{-k_{\text{ПТМ}}t}$ , где  $P_{\text{ПТМ}}(t)$  представляет собой долю посттрансляционной модификации в виде функции времени;  $P_0$  представляет собой исходное процентное содержание посттрансляционной модификации и  $k_{\text{ПТМ}}$  представляет собой константу скорости посттрансляционной модификации.

3. Способ по п.1 или 2, дополнительно включающий определение воздействия на субъекта антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией, в котором определение воздействия на субъекта антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией включает определение площади под кривой (AUC) концентрации антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором сывороточную концентрацию антитела описывают уравнением двухкомпарментной фармакокинетической модели в виде  $C(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ , где A и B представляют собой гибридные коэффициенты при условии, что  $\alpha$  и  $\beta$  представляют собой гибридные константы первого порядка соответственно.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором антитело содержит рекомбинантное терапевтическое моноклональное антитело.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором PQA может влиять на стабильность, безопасность и/или эффективность лекарственного средства.

7. Способ по любому из пп.1-6, причем способ используют для прогнозирования или отслеживания профиля посттрансляционной модификации антитела.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором посттрансляционная модификация включает в себя одно или более из дезамидирования, окисления, гликирования, образования дисульфидов, образования N-концевого пироглутамата, удаления C-концевого лизина и гликозилирования с высоким содержанием маннозы.

9. Способ по любому из пп.1-8, дополнительно включающий моделирование корреляции между фармакокинетической концентрацией и долей вариантов посттрансляционной модификации.

10. Способ по любому из пп.1-9, дополнительно включающий количественное оценивание и прогнозирование воздействия на субъекта репрезентативной посттрансляционной модификации в схеме либо однократного, либо многократного введения.

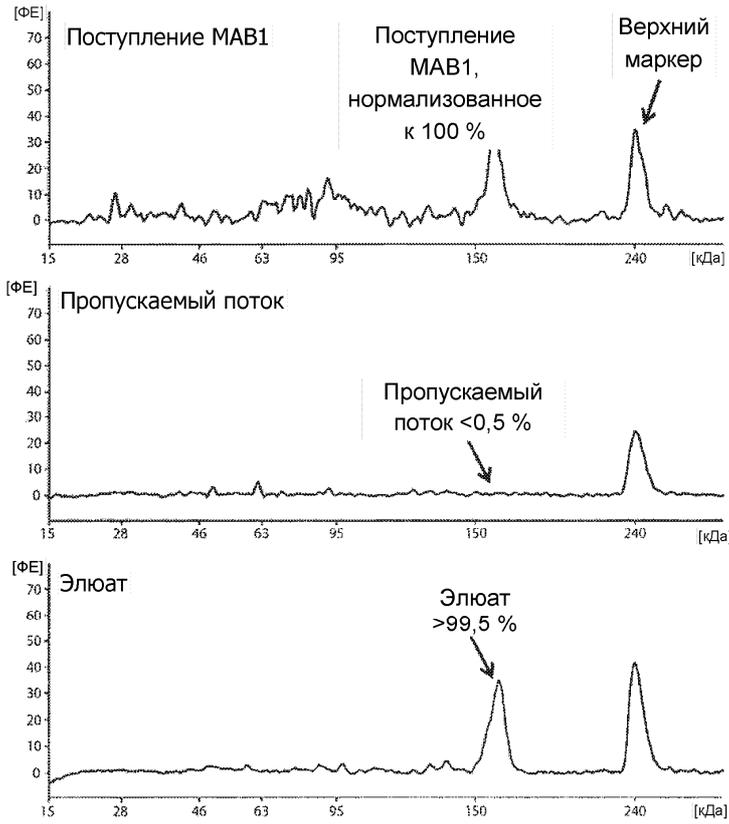
11. Способ по любому из пп.1-10, дополнительно включающий прогнозирование максимального и минимального уровней посттрансляционной модификации, наблюдаемых в схеме многократного введения.

12. Способ по любому из пп.1-11, дополнительно включающий введение антитела субъекту.

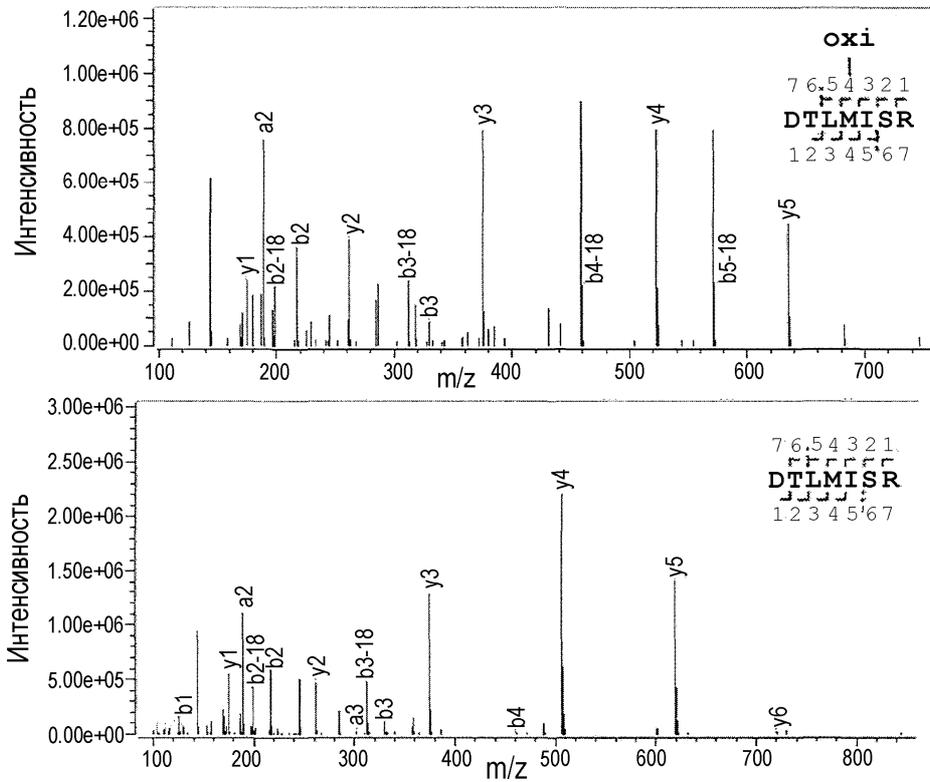
13. Способ по любому из пп.1-12, дополнительно включающий определение общей концентрации антитела *in vivo* у субъекта.

14. Способ по любому из пп.1-13, дополнительно включающий прогнозирование концентрации *in vivo* перед введением дозы антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией.

15. Способ по любому из пп.1-14, дополнительно включающий прогнозирование концентрации *in vivo* после введения дозы антитела с представляющей интерес посттрансляционной модификацией.

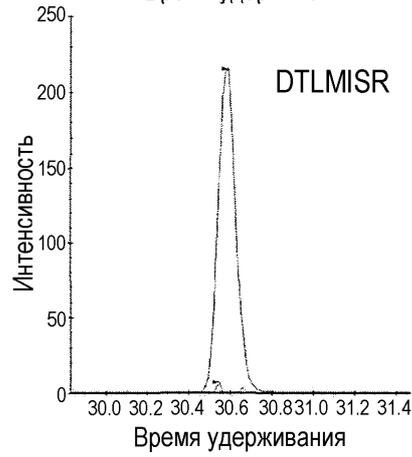
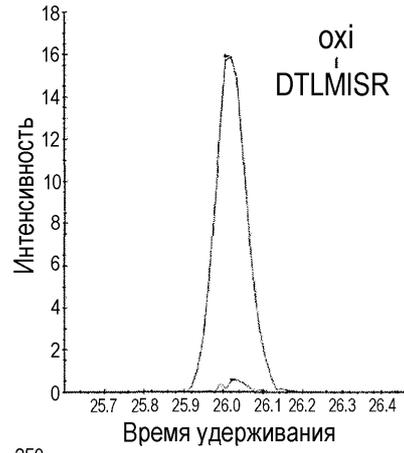


Фиг. 1

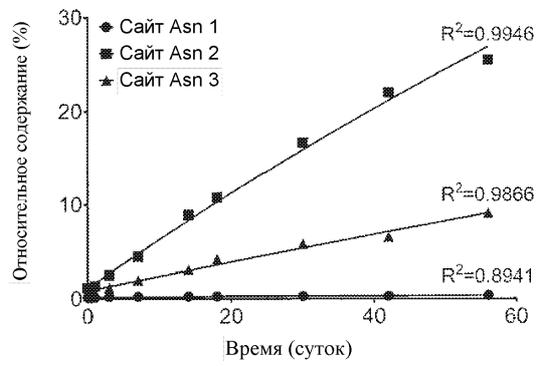


Фиг. 2А

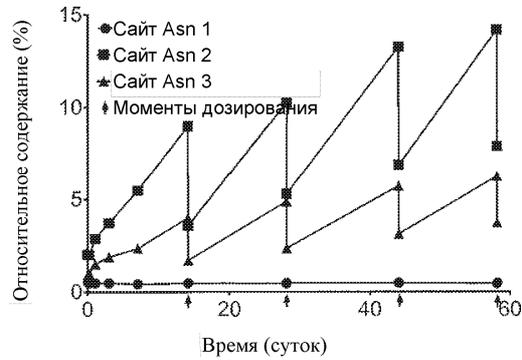
046201



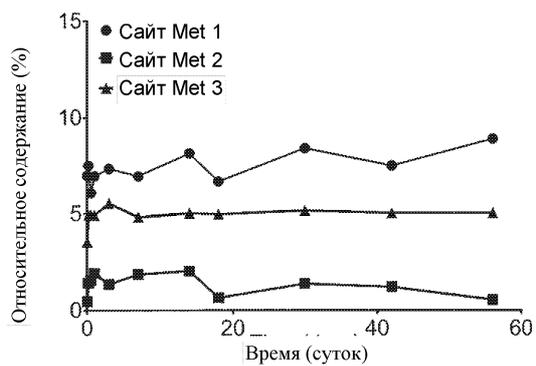
Фиг. 2В



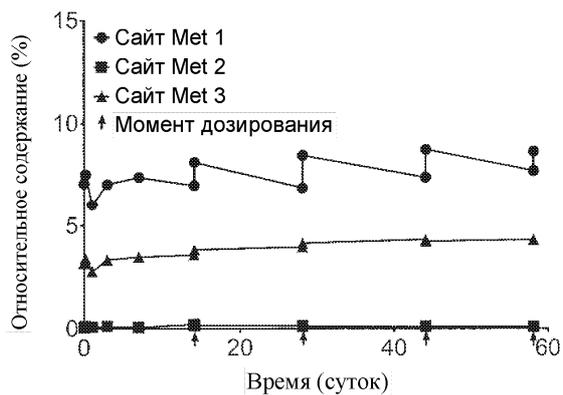
Фиг. 3А



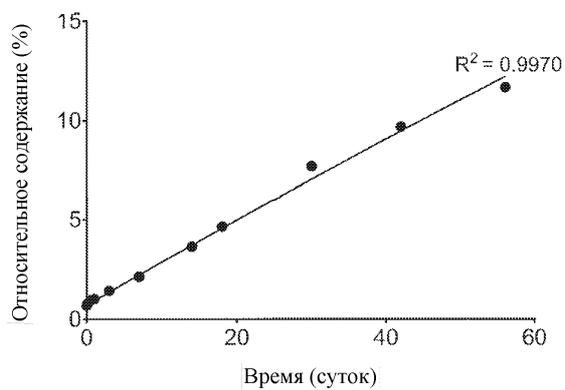
Фиг. 3В



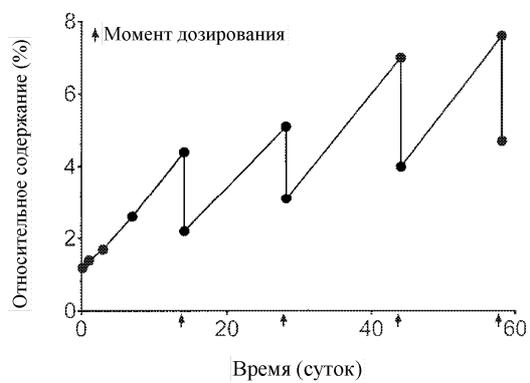
Фиг. 4А



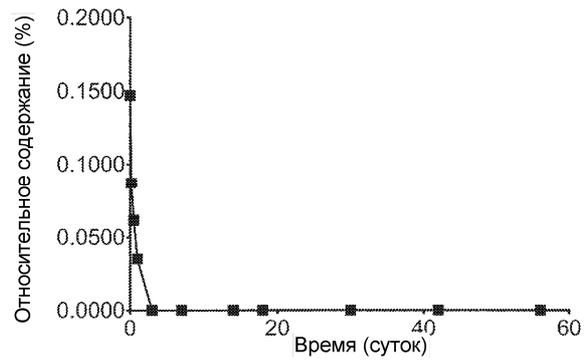
Фиг. 4В



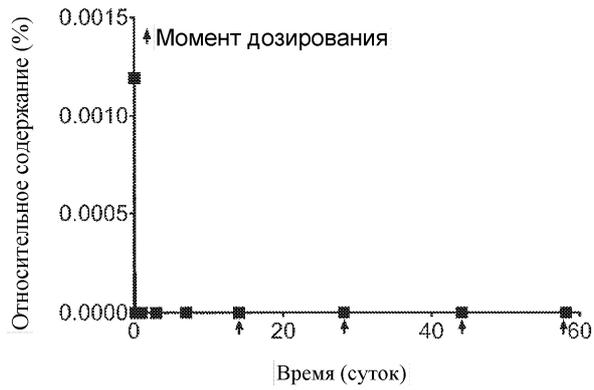
Фиг. 5А



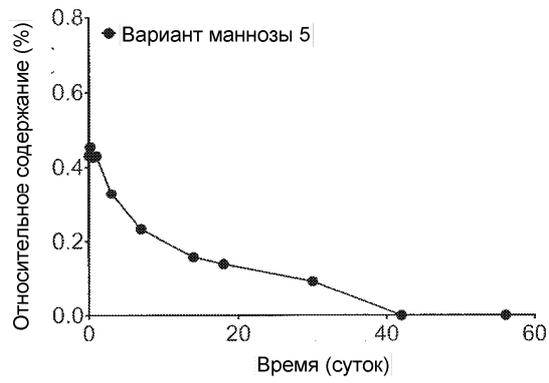
Фиг. 5В



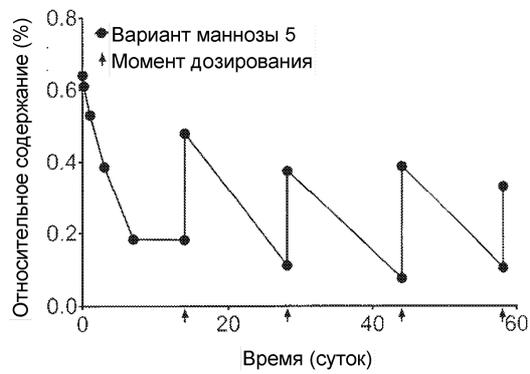
Фиг. 6А



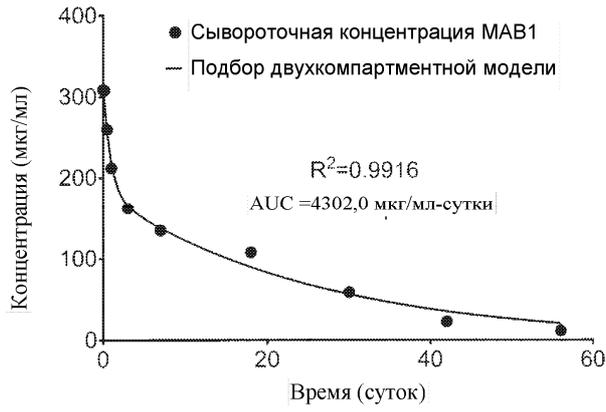
Фиг. 6В



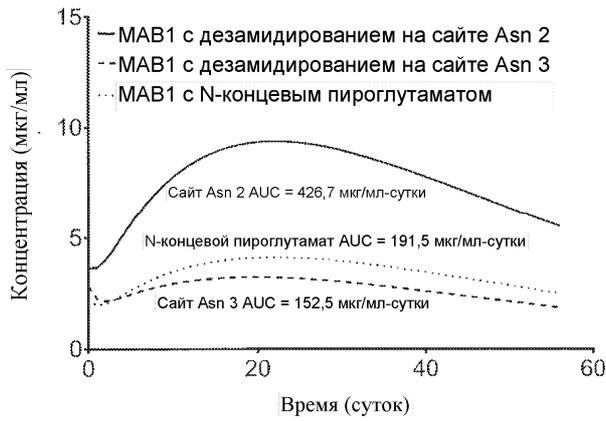
Фиг. 7А



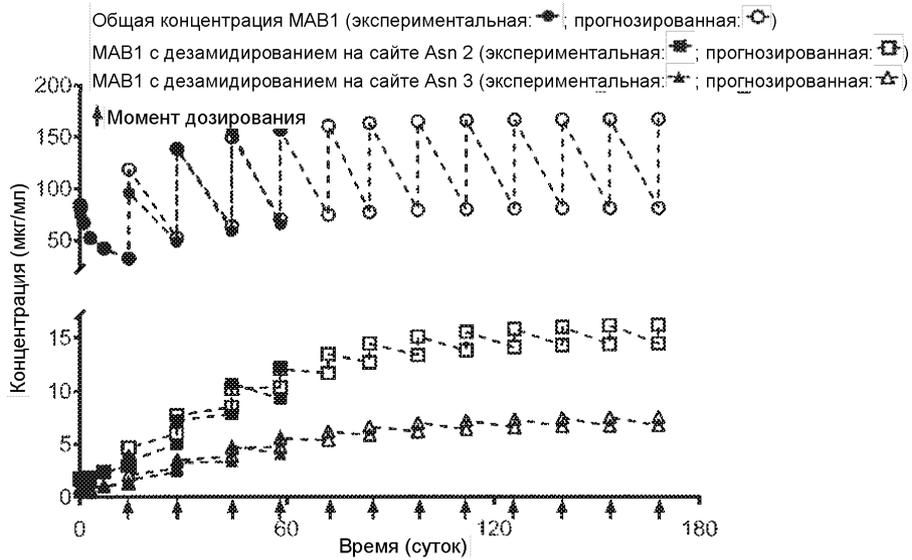
Фиг. 7В



Фиг. 8А



Фиг. 8В



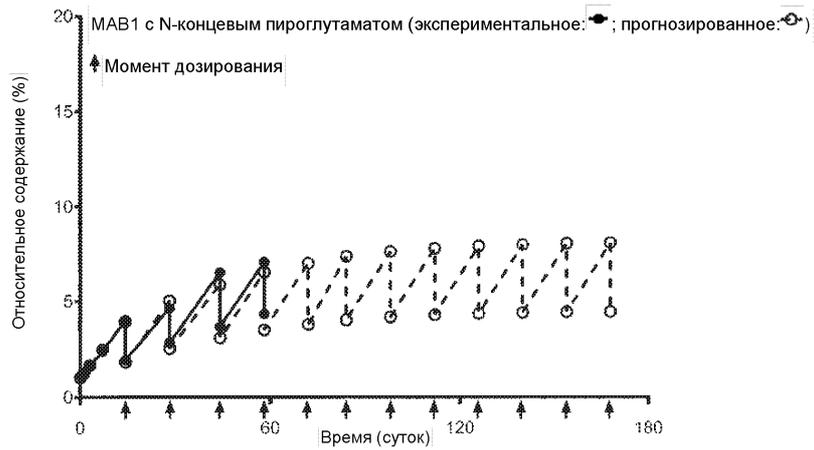
Фиг. 9А



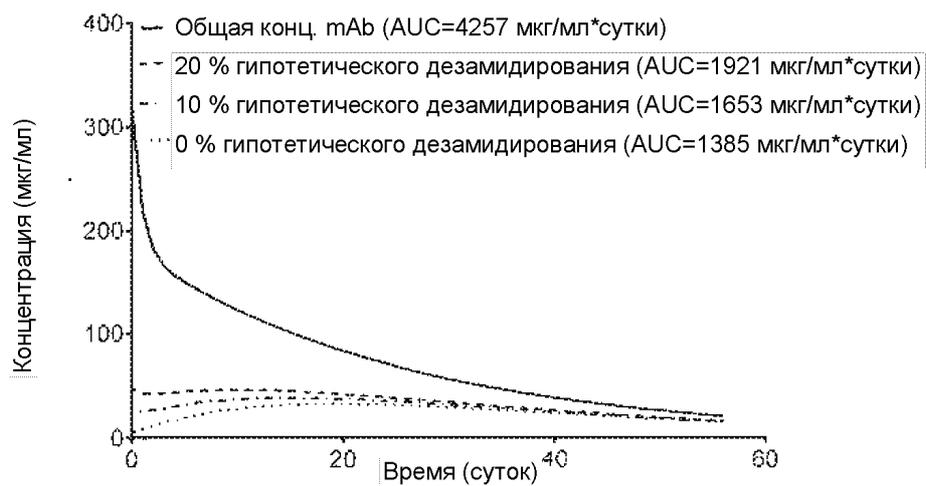
Фиг. 9В



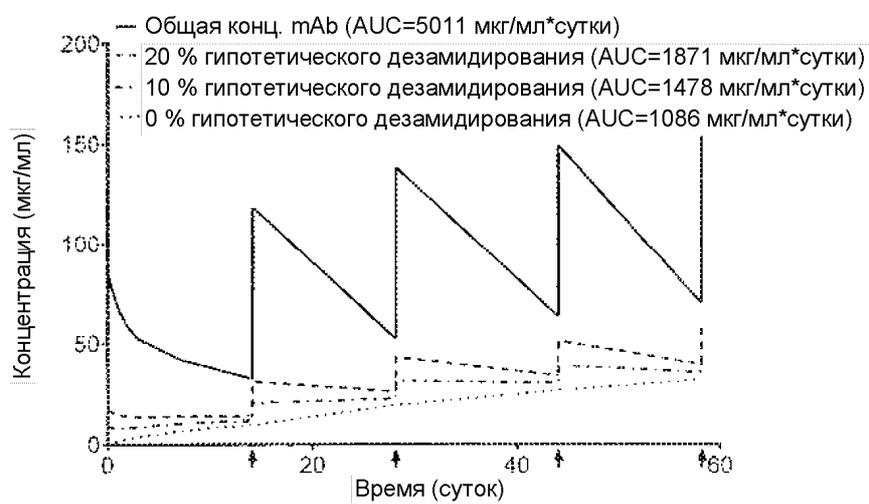
Фиг. 10А



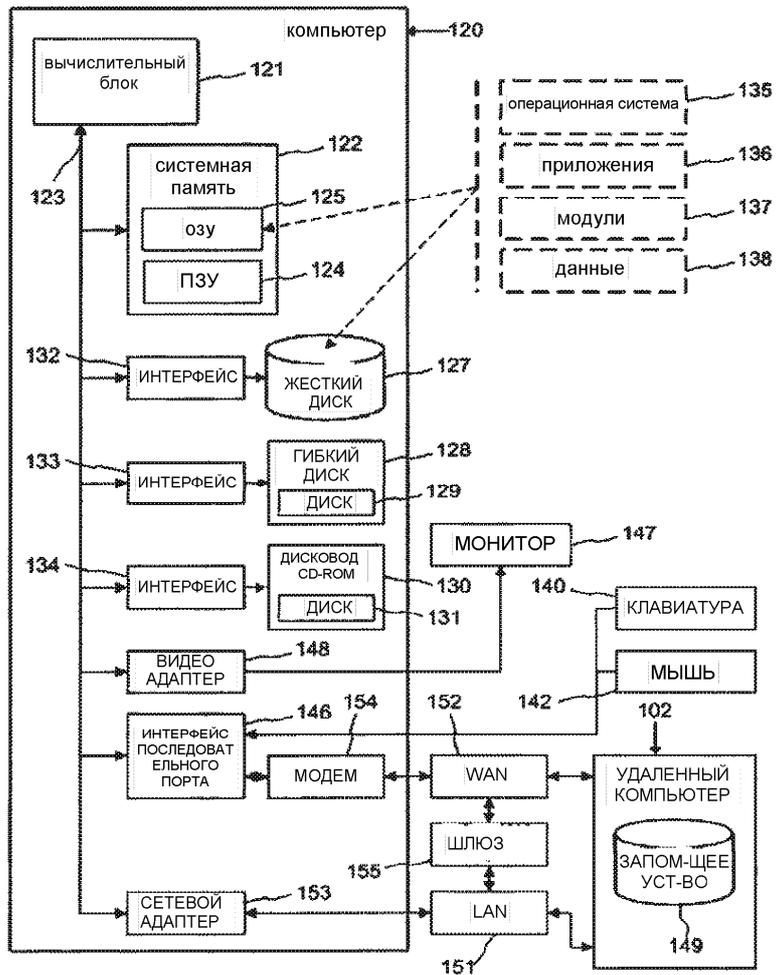
Фиг. 10В



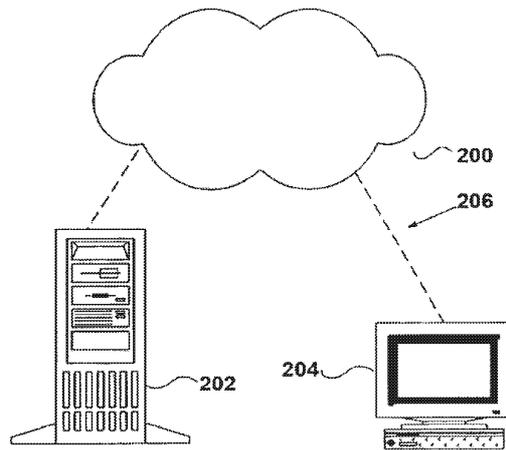
Фиг. 11А



Фиг. 11В



Фиг. 12



Фиг. 13

