



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.03.13

(21) Номер заявки
202292454

(22) Дата подачи заявки
2021.02.27

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)

(54) СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ ДЕГРАДАЦИИ ПОЛИСОРБАТА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВАХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

(31) 62/982,346; 63/021,181; 63/073,125

(32) 2020.02.27; 2020.05.07; 2020.09.01

(33) US

(43) 2022.12.14

(86) PCT/US2021/020133

(87) WO 2021/174151 2021.09.02

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

(72) Изобретатель:
Сяо Хой, Чжан Сиси (US)

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

(56) WO-A2-2021007504
WO-A1-2016057739

Li Xuanwen ET AL. "Profiling Active Enzymes for Polysorbate Degradation in Biotherapeutics by Activity-Based Protein Profiling", bioRxiv, 8 October 2020 (2020-10-08), pages 1-34, XP055809526, DOI: 10.1101/2020.10.07.330076 Retrieved from the Internet: URL: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.10.07.330076v1.full.pdf>, [retrieved on 2021-06-01], see "materials and methods" and "results"

ZHANG SISI ET AL. "Rapid Polysorbate 80 Degradation by Liver Carboxylesterase in a Monoclonal Antibody Formulated Drug Substance at Early Stage Development", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 109, no. 11, 1 November 2020 (2020-11-01), pages 3300-3307, XP055809286, US ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1016/j.xphs.2020.07.018, Retrieved from the Internet: URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2020.07.018>, page 3302 - page 3306; figures; table 1

TROII HALL ET AL. "Polysorbates 20 and 80 Degradation by Group XV Lysosomal Phospholipase A 2 Isomer X1 in Monoclonal Antibody Formulations", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 105, no. 5, 1 May 2016 (2016-05-01), pages 1633-1642, XP055434435, US ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1016/j.xphs.2016.02.022, cited in the application, page 1633 - page 1641

JIN HYOUNG PARK ET AL. "Proteomic Analysis of Host Cell Protein Dynamics in the Culture Supernatants of Antibody-Producing CHO Cells", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 10 March 2017 (2017-03-10), pages 1-13, XP055625830, DOI: 10.1038/srep44246, see discussion; page 8 - page 10

MARTIN VANDERLAAN ET AL. "Hamster Phospholipase B-Like 2 (PLBL2): A Host-Cell Protein Impurity in Therapeutic Monoclonal Antibodies Derived from Chinese Hamster Ovary Cells", BIOPROCESS INTERNATIONAL, vol. 13, no. 4, 14 April 2015 (2015-04-14), pages 18-55, XP055337487, page 20 - page 29

MCSHAN A.C. ET AL. "Hydrolysis of Polysorbate 20 and 80 by a Range of Carboxylester Hydrolases", PDA JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, vol. 70, no. 4, 1 July 2016 (2016-07-01), pages 332-345, XP055811872, US ISSN: 1079-7440, DOI: 10.5731/pdajpst.2015.005942, Retrieved from the Internet: URL: <http://dx.doi.org/10.5731/pdajpst.2015.005942>, the whole document

TRAN BENJAMIN ET AL. "Investigating interactions between phospholipase B-Like 2 and antibodies during Protein A chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1438, 22 January 2016 (2016-01-22), pages 31-38, XP029436225, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2016.01.047, page 31 - page 37

(57) Изобретение относится к композициям со сниженным остаточным уровнем липаз и способам получения таких композиций. В частности, данное изобретение относится к композициям и способам получения таких композиций путем деплеции в указанных композициях определенных липаз, таких как белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе B-1, и белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе 1.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке испрашивается приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 62/982346, поданной 27 февраля 2020 года, предварительной заявки на патент США № 63/021181, поданной 7 мая 2020 года, и предварительной заявки на патент США № 63/073125, поданной 1 сентября 2020 года, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Область техники

Данное изобретение в целом относится к композициям со сниженным количеством определенных липаз, способам получения таких композиций и способам снижения деградации полисорбата, вызванной присутствием таких липаз. В частности, данное изобретение в целом относится к композициям и способам получения композиций со сниженным присутствием белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе В1, и белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1.

Уровень техники

Среди лекарственных средств биотерапевтические препараты на основе белка являются важным классом лекарственных препаратов, которые обеспечивают высокий уровень селективности, активности и эффективности, о чем свидетельствует значительный рост числа клинических испытаний с моноклональными антителами (мАт) за последние несколько лет. Внедрение биотерапевтического агента на основе белка в клинику может занять много лет и требовать координированных усилий в различных областях исследований и разработок, включая открытие, разработку процесса и фармацевтического состава, аналитическую характеристику и доклинические токсикологические и фармакологические исследования.

Одним из важнейших аспектов клинически и коммерчески целесообразного биотерапевтического агента является стабильность лекарственного продукта с точки зрения производственного процесса, а также продолжительность срока годности. Это часто требует соответствующих шагов, направленных на повышение физической и химической стабильности биотерапевтических агентов на основе белка в условиях различных растворов и сред, необходимых для производства и хранения, с минимальным воздействием на качество продукта, включая идентификацию молекул с большей первичной стабильностью, белковую инженерию и разработку фармацевтического состава. Поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат, часто применяются для повышения физической стабильности биотерапевтического продукта на основе белка. Более семидесяти процентов продаваемых терапевтических препаратов с моноклональными антителами содержат от 0,001% до 0,1% полисорбата, одного из видов поверхностно-активных веществ, для придания физической стабильности биотерапевтическим агентам на основе белка. Полисорбаты подвержены самоокислению и гидролизу, что приводит к образованию свободных жирных кислот и последующему образованию частиц жирных кислот. Деградация полисорбата может иметь негативный эффект на качество лекарственного продукта, поскольку полисорбат может защищать от межфазных напряжений, таких как агрегация и адсорбция. Присутствие некоторых липаз может быть вероятной причиной деградации полисорбатов в фармацевтическом составе. Следовательно, такие липазы в лекарственных препаратах необходимо выявлять, мониторировать и снижать их уровень.

Прямой анализ липаз может потребовать выделения продукта в достаточном количестве для анализа, что нежелательно и возможно только в отдельных случаях. Следовательно, определение технологического процесса и аналитических тестов, необходимых для характеристики липаз, ответственных за деградацию полисорбата в образце, является сложной задачей. В дополнение к выявлению липаз, ответственных за деградацию полисорбата, лекарственный продукт должен быть получен способами очистки, которые удаляют или снижают уровень таких липаз.

Следует понимать, что существует потребность в способах деплеции липазы из фармацевтического состава лекарственного продукта.

Краткое описание сущности изобретения

Поддержание стабильности фармацевтических составов лекарственных препаратов не только во время хранения, но и во время производства, транспортировки, обработки и введения, является серьезной проблемой. Белковые биотерапевтические агенты становятся все более популярными среди лекарственных продуктов благодаря своей эффективности и универсальности. Одной из основных проблем при разработке белковых биотерапевтических агентов является преодоление ограниченной стабильности белка и эксципиентов в продуктах, на которые может повлиять присутствие липаз (присутствующих в виде белков клетки-хозяина). Оценка влияния липаз на фармацевтический состав лекарственного препарата и снижение уровня таких липаз может быть важным шагом в разработке фармацевтического состава лекарственного препарата, за которой следуют способы получения фармацевтического состава лекарственного препарата со сниженным содержанием липаз и повышенной стабильностью благодаря снижению уровню липаз.

В одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения представлен способ деплеции липазы из образца, включающий в себя приведение указанного образца, содержащего липазу, в контакт с зондом, при этом указанный зонд обладает способностью связываться с указанной липазой с образованием комплекса и отделять указанный комплекс от указанного образца, тем самым удаляя указанную липазу из указанного образца. В одном аспекте данного изобретения указанный образец может содер-

жать белок, представляющий интерес. В одном аспекте данного изобретения указанный образец может содержать полисорбатный эксципиент. В конкретном аспекте данного изобретения указанный полисорбатный эксципиент может быть выбран из полисорбата-20, полисорбата-60, полисорбата-80 или их комбинаций. В еще одном конкретном аспекте данного изобретения указанный полисорбатный эксципиент представляет собой полисорбат-80.

В одном аспекте данного изобретения указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе В1. В другом аспекте данного изобретения указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе 1. В одном аспекте данного изобретения указанная липаза обладает способностью приводить к деградации полисорбата в указанном образце. Следовательно, способ согласно данному варианту осуществления данного изобретения снижает деградацию полисорбатов за счет удаления липазы из указанного образца.

В одном аспекте данного изобретения указанный зонд может обладать способностью связываться с твердой подложкой. В конкретном аспекте данного изобретения указанная твердая подложка может представлять собой агарозные гранулы или магнитные гранулы.

В одном аспекте данного изобретения указанный зонд может быть прикреплен к твердой подложке с помощью лиганда. В конкретном аспекте данного изобретения указанный лиганд может представлять собой индикатор, молекулу биотина, модифицированную молекулу биотина, нуклеиновую кислоту, последовательность, эпитопную метку, молекулу с низким содержанием электронов или молекулу с высоким содержанием электронов.

В одном аспекте данного изобретения указанный способ может дополнительно включать в себя извлечение указанной липазы из указанного комплекса.

В одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения представлен способ очистки образца, содержащего белок, представляющий интерес, и липазу, включающий в себя приведение указанного образца в контакт с зондом, при этом указанный зонд обладает способностью связываться с указанной липазой с образованием комплекса и отделять указанный комплекс от указанного образца. В одном аспекте данного изобретения указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе В1. В другом аспекте данного изобретения указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе 1.

В одном аспекте данного изобретения указанный образец содержит полисорбатный эксципиент. В конкретном аспекте данного изобретения указанный полисорбатный эксципиент может быть выбран из полисорбата-20, полисорбата-60, полисорбата-80 или их комбинаций. В еще одном конкретном аспекте данного изобретения указанный полисорбатный эксципиент может представлять собой полисорбат-80.

В одном аспекте данного изобретения указанный зонд может обладать способностью связываться с твердой подложкой. В конкретном аспекте данного изобретения указанная твердая подложка может представлять собой агарозные гранулы или магнитные гранулы.

В одном аспекте данного изобретения указанный зонд может быть прикреплен к твердой подложке с помощью лиганда. В конкретном аспекте данного изобретения указанный лиганд может представлять собой индикатор, молекулу биотина, модифицированную молекулу биотина, нуклеиновую кислоту, последовательность, эпитопную метку, молекулу с низким содержанием электронов или молекулу с высоким содержанием электронов.

В одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения представлен способ снижения деградации полисорбата в образце, включающий в себя приведение указанного образца, содержащего липазу и полисорбат, в контакт с зондом, при этом указанный зонд обладает способностью связываться с указанной липазой с образованием комплекса и отделять указанный комплекс от указанного образца, тем самым снижая деградацию полисорбата в указанном образце.

В одном аспекте данного изобретения указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе В1. В другом аспекте данного изобретения указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе 1.

В одном аспекте данного изобретения указанный образец может содержать белок, представляющий интерес. В одном аспекте данного изобретения указанный образец может содержать полисорбатный эксципиент. В конкретном аспекте данного изобретения указанный полисорбатный эксципиент выбран из полисорбата-20, полисорбата-60, полисорбата-80 или их комбинаций. В еще одном конкретном аспекте данного изобретения указанный полисорбатный эксципиент представляет собой полисорбат-80.

В одном аспекте данного изобретения указанный зонд может обладать способностью связываться с твердой подложкой. В конкретном аспекте данного изобретения указанная твердая подложка может представлять собой агарозные гранулы или магнитные гранулы.

В одном аспекте данного изобретения указанный зонд может быть прикреплен к твердой подложке с помощью лиганда. В конкретном аспекте данного изобретения указанный лиганд может представлять собой индикатор, молекулу биотина, модифицированную молекулу биотина, нуклеиновую кислоту, последовательность, эпитопную метку, молекулу с низким содержанием электронов или молекулу с высоким содержанием электронов.

В одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения представлена композиция,

содержащая белок, представляющий интерес, очищенный из клеток млекопитающих, и остаточное количество белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе В1. В одном аспекте данного изобретения остаточное количество белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе В1, составляет меньше чем около 5 ppm (частей на миллион). В другом аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать поверхностно-активное вещество. В еще одном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество может представлять собой гидрофильное неионное поверхностно-активное вещество. В другом аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество может представлять собой сложный эфир сорбитана и жирной кислоты. В конкретном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат. В другом конкретном аспекте данного изобретения концентрация полисорбата в указанной композиции может составлять от около 0,01% мас./об. до около 0,2% мас./об. В другом конкретном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат 80. В одном аспекте данного изобретения указанные клетки млекопитающих могут включать в себя клетку СНО.

В одном аспекте данного изобретения указанный белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе В1, может вызывать деградацию полисорбата 80.

В одном аспекте данного изобретения указанная композиция может представлять собой фармацевтический состав для парентерального введения.

В одном аспекте данного изобретения указанный белок, представляющий интерес, может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, слитый белок или комплекс антитело - лекарственный препарат. В одном аспекте данного изобретения концентрация указанного белка, представляющего интерес, может составлять от около 20 мг/мл до около 400 мг/мл.

В одном аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать один или большее число фармацевтически приемлемых эксципиентов. В другом аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать буфер, выбранный из группы, состоящей из гистидинового буфера, цитратного буфера, альгинатного буфера и аргининового буфера. В одном аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать модификатор тоничности. В еще одном аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать фосфат натрия.

В одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения представлена композиция, содержащая белок, представляющий интерес, очищенный из клеток млекопитающих, и остаточное количество белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе-1. В одном аспекте данного изобретения остаточное количество белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1, составляет меньше чем около 5 ppm. В другом аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать поверхностно-активное вещество. В еще одном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество может представлять собой гидрофильное неионное поверхностно-активное вещество. В другом аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество может представлять собой сложный эфир сорбитана и жирной кислоты. В конкретном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат. В другом конкретном аспекте данного изобретения концентрация полисорбата в указанной композиции может составлять от около 0,01% мас./об. до около 0,2% мас./об. В другом конкретном аспекте данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат 80. В одном аспекте данного изобретения указанные клетки млекопитающих могут включать в себя клетку СНО.

В одном аспекте данного изобретения указанный белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе-1, может вызывать деградацию полисорбата 80.

В одном аспекте данного изобретения указанная композиция может представлять собой фармацевтический состав для парентерального введения.

В одном аспекте данного изобретения указанный белок, представляющий интерес, может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, слитый белок или комплекс антитело - лекарственный препарат. В одном аспекте данного изобретения концентрация указанного белка, представляющего интерес, может составлять от около 20 мг/мл до около 400 мг/мл.

В одном аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать один или большее число фармацевтически приемлемых эксципиентов. В другом аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать буфер, выбранный из группы, состоящей из гистидинового буфера, цитратного буфера, альгинатного буфера и аргининового буфера. В одном аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать модификатор тоничности. В еще одном аспекте данного изобретения указанная композиция может дополнительно содержать фосфат натрия.

В одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения представлен способ выявления липазы в образце. В одном аспекте данного изобретения указанные липазы могут представлять собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе-1, и белок, подобный печеночной карбоксилэсте-

разе В1. В одном аспекте данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может включать в себя приведение указанного образца в контакт с серин-гидролазным зондом. В другом аспекте данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может включать в себя приведение указанного образца в контакт с серин-гидролазным зондом и их совместную инкубацию для образования комплекса липазы с указанным серин-гидролазным зондом. В другом аспекте данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может включать в себя отфильтровывание серин-гидролазного зонда, который не образует указанный комплекс липазы с указанным серин-гидролазным зондом.

В одном аспекте данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может дополнительно включать в себя приведение указанного образца в контакт с магнитными гранулами, обладающими способностью связываться с указанным серин-гидролазным зондом, так, чтобы указанные магнитные гранулы связались с указанным комплексом липазы с указанным серин-гидролазным зондом. Магнитные гранулы, связанные с указанным комплексом липазы с указанным серин-гидролазным зондом, можно далее извлекать из указанного образца и промывать буфером.

В другом аспекте данного изобретения указанный способ может дополнительно включать в себя извлечение указанных магнитных гранул, которые связаны с указанным комплексом липазы с указанным серин-гидролазным зондом, с образованием раствора, обогащенного липазами.

В одном аспекте данного изобретения указанный способ может дополнительно включать в себя добавление гидролизующего агента к указанному раствору для получения продуктов расщепления. В конкретном аспекте данного изобретения указанный гидролизующий агент может представлять собой трипсин. В другом аспекте данного изобретения указанный способ может дополнительно включать в себя анализ указанных продуктов расщепления для выявления указанных липаз. В одном аспекте данного изобретения указанные продукты расщепления можно анализировать с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте данного изобретения указанный масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом конкретном аспекте данного изобретения указанный масс-спектрометр может быть сопряжен с системой жидкостной хроматографии. В еще одном конкретном аспекте данного изобретения указанный масс-спектрометр может быть сопряжен с системой жидкостной хроматографии и мониторинга множественных реакций.

В одном аспекте данного изобретения указанный способ может дополнительно включать в себя добавление в указанный раствор белок-денатурирующего агента. В конкретном аспекте данного изобретения указанный белок-денатурирующий агент может представлять собой мочевины. В другом аспекте данного изобретения указанный способ может дополнительно включать в себя добавление в указанный раствор белок-восстанавливающего агента. В конкретном аспекте данного изобретения указанный белок-восстанавливающий агент может представлять собой ДТТ (дитиотреитол; англ. "DTT"). В одном аспекте данного изобретения указанный способ может дополнительно включать в себя добавление в указанный раствор белок-алкилирующего агента. В конкретном аспекте данного изобретения указанный белок-алкилирующий агент может представлять собой иодацетамид.

Эти и другие аспекты данного изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении вместе с нижеследующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Нижеследующее описание, хотя и указывает на различные варианты осуществления данного изобретения и их многочисленные конкретные детали, представлено в качестве иллюстрации, а не ограничения. В рамках объема данного изобретения могут выполняться множество замен, модификаций, дополнений или перестановок.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлены химические структуры главных компонентов полисорбатов. Полисорбаты главным образом состоят из сложных эфиров жирных кислот, имеющих общую головную группу, состоящую из ПОЭ-сорбитана, ПОЭ-изосорбида или ПОЭ, с олеиновой кислотой в качестве основной жирной кислоты для ПС80. На панели А справа представлена хроматограмма полного ионного тока (ПИТ, англ. "TIC") ПС80 в фармацевтическом составе мАт, полученная с помощью онлайн-анализа методом двухмерной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (двухмерная ЖХ/МС, англ. "2D-LC/MS"). Обозначенные пики идентифицированы как следующие: (1) ПОЭ - ПОЭ-изосорбид - ПОЭ-сорбитан, (2) ПОЭ-сорбитан-моноолеат, (3) ПОЭ-сорбитан-моноолеат, (4) ПОЭ-изосорбид-моноолеат и ПОЭ-моноолеат, (5) ПОЭ-сорбитан-линолеат/сложный диэфир олеата, (6) ПОЭ-сорбитан-диолеат, (7) ПОЭ-изосорбид-диолеат и ПОЭ-диолеат, (8) вероятно, ПОЭ-изосорбид/ПОЭ-линолеат/сложный диэфир олеата, поскольку масс-спектры слишком сложны для интерпретации, (9) смесь триолеата и тетраолеата ПОЭ-сорбитана. На панели В справа представлена хроматограмма с детекцией заряженного аэрозоля (ДЗА, англ. "CAD") ПС80 в фармацевтическом составе мАт, полученная с помощью онлайн-анализа методом двухмерной ЖХ/ДЗА (англ. "2D-LC/CAD").

На фиг. 2 представлена хроматограмма 0,1% ПС80 в 50 мг/мл мАт-1 после инкубации при температуре 5°C в 10 мМ гистидине, рН 6, в течение 0 ч и 36 ч согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения. Пики, элюированные между 11 и 17,5 мин, представляли собой ПОЭ, ПОЭ-изосорбид и ПОЭ-сорбитан.

На фиг. 3 представлен график процентного содержания остаточного ПС80 в зависимости от про-

должительности инкубации, где исходное мАт-1, мАт-1, смешанное с 0,125 мкМ, 0,5 мкМ и 2 мкМ зонда ФФ, обозначены заполненным кругом с черной сплошной линией, заполненным ромбом с красной пунктирной линией, заполненным квадратом с оранжевой пунктирной линией и заполненным треугольником с синей пунктирной линией.

На фиг. 4 представлена схема эксперимента по деплеции липазы (липаз) согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения. Стрептавидиновые магнитные гранулы Dynabeads связывали с зондом дестиобиотин-ФФ и применяли для деплеции липазы (липаз). Исходное мАт-1, элюированное мАт-1 и технологическое контрольное мАт-1 инкубировали с 0,1% ПС80 при температуре 5°C в течение 36 ч и подвергали измерению деградации ПС. Сконцентрированную(ые) липазу (липазы) подвергали расщеплению и анализу на предмет БКХ с помощью масс-спектрометрии.

На фиг. 5 представлен график процентного содержания остаточного ПС80 в исходном мАт-1, в технологическом контрольном мАт-1 и в мАт-1 после деплеции липазы (липаз), где исходное мАт-1, технологическое контрольное мАт-1 и мАт-1 после деплеции липазы (липаз) обозначены заполненным ромбом с черной сплошной линией, заполненным квадратом с синей пунктирной линией и заполненным кругом с оранжевой пунктирной линией.

На фиг. 6А представлена хроматограмма 0,1% ПС80 в 20 мкг/мл печеночной эстеразы кролика, приобретенной коммерческим путем, после инкубации при температуре 5°C в 10 мМ гистидине, рН 6, в течение 0 ч, 1,5 ч и 8 ч согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 6В представлена хроматограмма 0,1% ПС80 в 100 мкг/мл печеночной карбоксилэстеразы 1 человека, приобретенной коммерческим путем, после инкубации при температуре 5°C в 10 мМ гистидине, рН 6, в течение 0 ч, 5 ч и 18 ч согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 6С представлена хроматограмма 0,1% ПС80 в 50 мкг/мл мАт-1 после инкубации при температуре 5°C в 10 мМ гистидине, рН 6, в течение 0 ч, 18 ч и 36 ч согласно иллюстративному варианту осуществления данного изобретения.

На фиг. 6D представлено выравнивание последовательностей белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе В-1 (A0A061I7X9), белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1 (A0A061FE2) и печеночной карбоксилэстеразы человека (чКЭС-1, англ. "hCES-1").

Подробное описание сущности изобретения

Белки клетки-хозяина (БКХ, англ. "HCP") представляют собой класс примесей, которые должны быть удалены из всех белковых терапевтических препаратов клеточного происхождения. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (англ. "FDA") не установило максимально допустимый уровень БКХ, но концентрации БКХ в конечном лекарственном препарате должны контролироваться и воспроизводиться от партии к партии (FDA, 1999). Основная проблема безопасности связана с возможностью того, что БКХ могут вызывать антигенные эффекты у пациентов-людей (Satish Kumar Singh, Impact of Product-Related Factors on Immunogenicity of Biotherapeutics, and 100 JOURNALS of Pharmaceutical Sciences 354-387 (2011)). В дополнение к неблагоприятным последствиям для здоровья пациента, БКХ, обладающие ферментативной активностью, могут потенциально повлиять на качество продукта во время обработки или длительного хранения (Sharon X. Gao et al., Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity, 108 Biotechnology and Bioengineering 977-982 (2010); Flavie Robert et al., Degradation of an Fc-fusion recombinant protein by host cell proteases: Identification of a CHO cathepsin D protease, 104 Biotechnology and Bioengineering 1132-1141 (2009)). БКХ могут представлять наибольший риск вследствие их сохранения после производственного процесса очистки в конечном лекарственном продукте. При длительном хранении необходимо поддерживать критически важные качественные характеристики молекулы продукта, а разложение эксципиентов в конечном продукте - фармацевтическом составе необходимо свести к минимуму.

Некоторые фармацевтические составы лекарственных препаратов, представленные на рынке, содержат полисорбат в качестве одного из наиболее часто используемых неионогенных поверхностно-активных веществ в биофармацевтических белковых препаратах, которое может улучшить стабильность белка и защитить лекарственные препараты от агрегации и денатурации (Sylvia Kiese et al., Shaken, Not Stirred: Mechanical Stress Testing of an IgG1 Antibody, 97 Journal of Pharmaceutical Sciences 4347-4366 (2008); Ariadna Martos et al., Trends on Analytical Characterization of Polysorbates and Their Degradation Products in Biopharmaceutical Formulations, 106 Journal of Pharmaceutical Sciences 1722-1735 (2017)). Полисорбат 20 (ПС20) и полисорбат 80 (ПС80) являются наиболее часто используемыми неионными поверхностно-активными веществами в биофармацевтических белковых препаратах, которые могут улучшать стабильность белка и защищать лекарственные препараты от агрегации и денатурации. Типичные концентрации полисорбата в ряде лекарственных препаратов могут составлять от около 0,001% до около 0,1% (мас./об.), чтобы обеспечить достаточную стабильность белка.

Полисорбаты, однако, подвержены деградации, что может привести к нежелательному образованию частиц в составе лекарственных препаратов. Известно, что деградация полисорбатов происходит двумя основными путями: самоокислением и гидролизом. Было обнаружено, что окисление с большей вероят-

ностью происходит в ПС80 вследствие высокого содержания сложных эфиров ненасыщенных жирных кислот, тогда как в ПС20 окисление, как полагают, происходит по сложноэфирной связи в полиоксиэтиленовой цепи, что наблюдается не часто (Oleg V. Borisov, Junyan A. Ji & Y. John Wang, Oxidative Degradation of Polysorbate Surfactants Studied by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, 104 Journal of Pharmaceutical Sciences 1005-1018 (2015); Anthony Tomlinson et al., Polysorbate 20 Degradation in Biopharmaceutical Formulations: Quantification of Free Fatty Acids, Characterization of Particulates, and Insights into the Degradation Mechanism, 12 Molecular Pharmaceutics 3805-3815 (2015); Jia Yao et al., A Quantitative Kinetic Study of Polysorbate Autoxidation: The Role of Unsaturated Fatty Acid Ester Substituents, 26 Pharmaceutical Research 2303-2313 (2009)). В дополнение к этому, полисорбаты также могут подвергаться гидролизу путем разрыва сложноэфирной связи жирных кислот. Частицы, образующиеся при деградации полисорбатов, могут быть видимыми или даже незаметными, что может повысить потенциал иммуногенности в организме пациента и может оказывать различное влияние на качество лекарственного препарата. Одной из таких возможных примесей могут быть частицы жирных кислот, которые образуются при изготовлении, транспортировке, хранении, обращении или введении фармацевтических составов лекарственных препаратов, содержащих полисорбат. Частицы жирных кислот потенциально могут вызывать неблагоприятные иммуногенные эффекты и влиять на продолжительность срока годности. Кроме того, деградация полисорбатов может также привести к снижению общего уровня поверхностно-активного вещества в фармацевтическом составе, что влияет на стабильность продукта при его изготовлении, хранении, обращении и введении.

Как правило, деградацию полисорбата можно наблюдать в лекарственных препаратах только после довольно длительного хранения. Однако деградацию ПС80 наблюдали в одном препарате моноклонального антитела (мАТ) в течение 24 ч при температуре 4°C, хотя явно высококонцентрированной липазы выявлено не было, что позволяет предположить, что в данном лекарственном препарате присутствовала(и) неизвестная(ые) липаза(ы). Крайне важно выявлять и снижать концентрацию(и) такой(их) липазы(липаз), чтобы поддерживать стабильность фармацевтического состава лекарственного препарата.

Гипотетический содержащий домен фосфолипазы В белок 2 (СДФБ2, англ. "PLBD2") представляет собой первый белок клетки-хозяина, который, как было предложено, вызывает ферментативный гидролиз ПС20 (Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 Journal of Pharmaceutical Sciences 1657-1666 (2016)). Сообщалось, что печеночная эстераза свиньи способна специфически гидролизовать полисорбат 80 (не ПС20) и приводить к образованию ПС85 с течением времени в лекарственном продукте мАТ (Steven R. Labrenz, Ester Hydrolysis of Polysorbate 80 in mAb Drug Product: Evidence in Support of the Hypothesized Risk After the Observation of Visible Particulate in mAb Formulations, 103 Journal of Pharmaceutical Sciences 2268-2277 (2014)). Изомер X1 лизосомальной фосфолипазы А₂ группы XV (ЛФЛА₂, англ. "LPLA₂") продемонстрировал способность расщеплять ПС20 и ПС80 при концентрации меньше чем 1 ppm (Troii Hall et al., Polysorbates 20 and 80 Degradation by Group XV Lysosomal Phospholipase A 2 Isomer X1 in Monoclonal Antibody Formulations, 105 Journal of Pharmaceutical Sciences 1633-1642 (2016), и Ying Cheng et al., A Rapid High-Sensitivity Reversed-Phase Ultra High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry Method for Assessing Polysorbate 20 Degradation in Protein Therapeutics, 108 Journal of Pharmaceutical Sciences 2880-2886 (2019)).

Недавно ряд сложных карбоксиэфиров, включая липазу из *pseudomonas ceracia* на гранулах immovead 150 (PCL), липазу В из *candida antarctica* на гранулах immovead 150 (CALB), липазу из *thermomycetes lanuginosus* на гранулах immovead 150 (ЛТЛ, англ. "TLL"), печеночную эстеразу кролика (ПЭК, англ. "RLE"), липазу В из *Candida antarctica* (ЛБКА, англ. "CALB") и липазу поджелудочной железы свиньи II типа (ЛПЖС, англ. "PPL"), был выбран для изучения гидролиза двух уникальных ПС20 и ПС80, которые содержали 99% лауратных и 98% олеатных сложных эфиров, соответственно. Различные карбоксиэфиры проявляют уникальные паттерны деградации, указывающие на то, что паттерн деградации может быть использован для дифференциации ферментов, гидролизующих полисорбаты (A.C. Meshan et al., Hydrolysis of Polysorbate 20 and 80 by a Range of Carboxylester Hydrolases, 70 PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 332-345 (2016)). Может быть необходимо оценить влияние белка клетки-хозяина, совместно очищенного с лекарственным препаратом, на полисорбаты, чтобы обеспечить стабильность фармацевтического состава лекарственного препарата. Это может потребовать идентификации белка клетки-хозяина и его способности вызывать деградацию полисорбатов. Идентификация белков клетки-хозяина может быть особенно сложной задачей, поскольку присутствие БКХ обычно находится в диапазоне ppm, что затрудняет выделение и идентификацию БКХ.

В данном изобретении представлены улучшенные композиции, содержащие полисорбат с пониженным уровнем белков клетки-хозяина, которые могут вызывать деградацию полисорбата(ов), способы выявления таких белков клетки-хозяина и способы деплеции таких белков клетки-хозяина.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в контексте данного документа, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Несмотря на то, что при воплощении на практике или при испытании могут применяться любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном

документе, предпочтительные способы и материалы представлены в данном документе. Все публикации, указанные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки.

Термин в единственном числе следует понимать как означающий "по меньшей мере один"; термины "около" и "приблизительно" следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают рядовые специалисты в данной области техники; для всех указанных в данном документе диапазонов в их объем включаются крайние точки указанных диапазонов.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлена композиция, содержащая белок, представляющий интерес, полисорбат и остаточное количество липазы.

При употреблении в контексте данного документа термин "композиция" относится к активному фармацевтическому агенту, который составлен в смеси вместе с одним или большим числом фармацевтически приемлемых носителей.

При употреблении в контексте данного документа термин "активный фармацевтический агент" может включать в себя биологически активный компонент лекарственного препарата. Активный фармацевтический агент может относиться к любому соединению или комбинации соединений, используемых в лекарственном препарате, предназначенным для обеспечения фармакологической активности или для иного прямого эффекта при диагностике, лечении, смягчении, терапии или профилактике заболевания, или для прямого эффекта при восстановлении, коррекции или модификации физиологических функций у животных. Неограничивающие способы получения активного фармацевтического агента могут включать в себя применение процесса ферментации, применение технологии рекомбинантной ДНК, выделение и извлечение из природных ресурсов, химический синтез или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения содержание активного фармацевтического агента в указанном фармацевтическом составе может варьировать от около 0,01 мг/мл до около 600 мг/мл. В некоторых конкретных вариантах осуществления данного изобретения содержание активного фармацевтического агента в указанном фармацевтическом составе может составлять около 0,01 мг/мл, около 0,02 мг/мл, около 0,03 мг/мл, около 0,04 мг/мл, около 0,05 мг/мл, около 0,06 мг/мл, около 0,07 мг/мл, около 0,08 мг/мл, около 0,09 мг/мл, около 0,1 мг/мл, около 0,2 мг/мл, около 0,3 мг/мл, около 0,4 мг/мл, около 0,5 мг/мл, около 0,6 мг/мл, около 0,7 мг/мл, около 0,8 мг/мл, около 0,9 мг/мл, около 1 мг/мл, около 2 мг/мл, около 3 мг/мл, около 4 мг/мл, около 5 мг/мл, около 6 мг/мл, около 7 мг/мл, около 8 мг/мл, около 9 мг/мл, около 10 мг/мл, около 15 мг/мл, около 20 мг/мл, около 25 мг/мл, около 30 мг/мл, около 35 мг/мл, около 40 мг/мл, около 45 мг/мл, около 50 мг/мл, около 55 мг/мл, около 60 мг/мл, около 65 мг/мл, около 70 мг/мл, около 80 мг/мл, около 85 мг/мл, около 90 мг/мл, около 100 мг/мл, около 110 мг/мл, около 120 мг/мл, около 130 мг/мл, около 140 мг/мл, около 150 мг/мл, около 160 мг/мл, около 170 мг/мл, около 180 мг/мл, около 190 мг/мл, около 200 мг/мл, около 225 мг/мл, около 250 мг/мл, около 275 мг/мл, около 300 мг/мл, около 325 мг/мл, около 350 мг/мл, около 375 мг/мл, около 400 мг/мл, около 425 мг/мл, около 450 мг/мл, около 475 мг/мл, около 500 мг/мл, около 525 мг/мл, около 550 мг/мл, около 575 мг/мл или около 600 мг/мл.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения pH указанной композиции может составлять больше чем около 5,0. В одном иллюстративном варианте осуществления данного изобретения указанный pH может составлять больше чем около 5,0, больше чем около 5,5, больше чем около 6, больше чем около 6,5, больше чем около 7, больше чем около 7,5, больше чем около 8 или больше чем около 8,5.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный активный фармацевтический агент может представлять собой белок, представляющий интерес.

При употреблении в контексте данного документа термин "белок" или "белок, представляющий интерес" может включать в себя любой полимер из аминокислот, содержащий ковалентные амидные связи. Белки включают в себя одну или большее число полимерных цепей аминокислот, как правило известных в данной области техники как "полипептиды". "Полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, их родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их не встречающихся в природе синтетических аналогов, связанных пептидными связями, их родственными встречающимися в природе структурными вариантами и их не встречающимися в природе синтетическими аналогами. "Синтетические пептиды или полипептиды" относится к не встречающимся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматизированного синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные способы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или большее число полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. Белок может включать в себя любой биотерапевтический белок, рекомбинантный белок, используемый в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие химерные рецепторные Fc-слитые белки, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, антитела человека и биспецифические антитела. В другом иллюстративном аспекте данного изобретения белок может включать в себя фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и тому подобное. Белки можно получать с использованием рекомбинантных клеточных систем получения, таких как бакуловирусная система насекомых, системы дрожжей (например, *Pichia sp.*), системы млеко-

питающих (например, клетки CHO и производные от клеток CHO, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор, в котором обсуждаются биотерапевтические белки и их получение, см. в работе Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (Darius Ghaderi et al., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 147-176 (2012)). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Указанные модификации, аддукты и фрагменты включают в себя, например, авидин, стрептавидин, молекулу биотина, модифицированную молекулу биотина, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), полиэтиленгликоль (ПЭГ), полигистидин, метку FLAGtag, мальтозосвязывающий белок (МСБ), хитинсвязывающий белок (ХСБ), глутатион-S-трансферазу (ГСТ), эпитоп тус, флуоресцентные метки и другие красители, и тому подобное. Белки можно классифицировать на основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать в себя простые белки, такие как глобулярные белки и фибрилные белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения белок, представляющий интерес, может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В конкретном аспекте данного изобретения белок, представляющий интерес, может представлять собой афлиберцепт (см. патентный документ US 7279159, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки).

При употреблении в контексте данного документа термин "антитело" включает в себя иммуноглобулиновые молекулы, содержащие четыре полипептидные цепи - две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_H1 , C_H2 и C_H3 . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_H и V_L могут далее подразделяться на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), со вставками более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления данного изобретения области FR антитела против big-ET-1 (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть природным образом или искусственным образом модифицированы. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основе параллельного анализа двух или большего числа CDR.

При употреблении в контексте данного документа термин "антитело" также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. При употреблении в контексте данного документа термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и тому подобное включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела можно получить, например, из целых молекул антител, используя любые стандартные методики, такие как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генной инженерии, включающие в себя манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены. Такая ДНК известна и (или) легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или ее можно синтезировать. ДНК можно секвенировать и манипулировать ею химическим путем или с помощью методик молекулярной биологии, например, для упорядочения одного или большего числа переменных и (или) константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

При употреблении в контексте данного документа "фрагмент антитела" включает в себя часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают в себя, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина со-

единены пептидным линкером. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность родительского антитела, фрагментом которого он является, чтобы он связывался с тем же антигеном, что и указанное родительское антитело; в некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, близкой к таковой у указанного родительского антитела и (или) конкурирует с указанным родительским антителом за связывание с соответствующим антигеном. Фрагмент антитела можно получить любыми способами. Например, фрагмент антитела можно получить ферментативным или химическим путем посредством фрагментации интактного антитела и (или) его можно получить рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В качестве альтернативы или дополнения, фрагмент антитела можно полностью или частично получить синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно включать в себя одноцепочечный фрагмент антитела. В качестве альтернативы или дополнения, фрагмент антитела может включать в себя несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно включать в себя мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела, как правило, содержит по меньшей мере около 50 аминокислот и, более часто, содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

Фраза "биспецифическое антитело" включает в себя антитело, способное избирательно связывать два или большее число эпитопов. Биспецифические антитела, как правило, содержат две разные тяжелые цепи, при этом каждая тяжелая цепь специфически связывает различный эпитоп - либо на двух разных молекулах (например, антигенах), либо на одной и той же молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно избирательно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой тяжелой цепи к указанному первому эпитопу, как правило, будет по меньшей мере на один-два или три-четыре порядка величины ниже, чем аффинность указанной первой тяжелой цепи к указанному второму эпитопу, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же мишени или на разных мишенях (например, на одном и том же белке или на разных белках). Биспецифические антитела можно получать, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают различные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают различные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности можно экспрессировать в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

Иллюстративное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых содержит три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен C_{H1} , шарнир, домен C_{H2} и домен C_{H3} , и легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает специфичности связывания с антигеном, но которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью, либо которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или большее число эпитопов, связанных антигенсвязывающими участками тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. Биспецифические антитела (bsAb, англ. "bsAb") можно разделить на два основных класса: те, которые содержат область Fc (IgG-подобные), и те, в которых отсутствует область Fc, при этом последние обычно имеют меньший размер, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные bsAb могут иметь различные форматы, такие как, но не ограничиваясь ими, трио-mAb (англ. "triomab"), IgG со впадинами и выступами (IgG-BB, англ. "kih IgG"), кросс-mAb (англ. "crossMab"), орто-Fab IgG (англ. "orth-Fab IgG"), Ig с двумя переменными доменами (Ig-ДВД, англ. "DVD-Ig"), двойные Fab или Fab двойного действия (ФДД, англ. "DAF"), IgG с одноцепочечным Fv (IgG-оцFv, англ. "IgG-scFv") или κλ-тела. Не IgG-подобные различные форматы включают в себя тандемные scFv, формат диатела, одноцепочечное диатело, тандемные диатела (танд-Ab, англ. "TandAb"), молекулу с двойной аффинностью для ретаргетинга (ДАР, англ. "DART"), ДАР-Fc (англ. "DART-Fc"), нанотела или антитела, полученные методом "смыкание и блокировка" (англ. "dock-and-lock", DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & minutes gju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 Journal of Hematology & Oncology 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, Handbook of Therapeutic Antibodies 265-310 (2014)).

Способы получения bsAb не ограничиваются технологией квадromы, основанной на соматическом слиянии двух различных линий клеток гибридомы, химической конъюгацией, которая включает в себя химические перекрестные линкеры, и генетическими подходами, использующими технологию рекомбинантной ДНК. Примеры bsAb включают в себя те, которые раскрыты в следующих заявках на патент, которые включены в данный документ посредством ссылки: заявка на патент США № 12/823838, поданная 25 июня 2010 года; заявка на патент США № 13/488628, поданная 5 июня 2012 года; заявка на патент США № 14/031075, поданная 19 сентября 2013 года; заявка на патент США № 14/808171, поданная 24 июля 2015 года; заявка на патент США № 15/713574, поданная 22 сентября 2017 года; заявка на патент США № 15/713569, поданная 22 сентября 2017 года; заявка на патент США № 15/386453, поданная 21 декабря 2016 года; заявка на патент США № 15/386443, поданная 21 декабря 2016 года; заявка на па-

тент США № 15/22343 поданная 29 июля 2016 года; и заявка на патент США № 15814095, поданная 15 ноября 2017 года. Низкие уровни примесей гомодимеров могут присутствовать на нескольких стадиях производства биспецифических антител. Выявление таких примесей гомодимеров может быть сложным процессом, если оно включает в себя применение анализа неповрежденной массы, из-за низкого содержания примесей гомодимеров и совместного вымывания этих примесей с основными фрагментами при использовании обычного метода жидкостной хроматографии.

При употреблении в контексте данного документа термин "мультиспецифическое антитело", или "мАт", относится к антителу, обладающим специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными антигенами. Хотя такие молекулы обычно связывают только два антигена (т.е. биспецифические антитела, бсАт), антитела с дополнительной специфичностью, такие как триспецифическое антитело и триспецифическое ВВ-антитело, также могут применяться в системе и способе, представленных в данном документе.

При употреблении в контексте данного документа термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело можно получить из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любым способом, доступным или известным в данной области техники. Моноклональные антитела, пригодные для данного изобретения, можно получить с помощью широкого спектра способов, известных в данной области техники, включая применение гибридомных технологий, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинаций.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения белок, представляющий интерес, может иметь рI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном иллюстративном конкретном варианте осуществления данного изобретения указанный рI может составлять около 4,5, около 5,0, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1, около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9, около 8,0, около 8,1, около 8,2, около 8,3, около 8,4, около 8,5, около 8,6, около 8,7, около 8,8, около 8,9 или около 9,0.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения в указанных композициях содержится по меньшей мере два типа белков, представляющих интерес. В некоторых конкретных вариантах осуществления данного изобретения одно из указанных по меньшей мере двух белков, представляющих интерес, может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, слитый белок или комплекс антитело - лекарственный препарат. В некоторых других конкретных вариантах осуществления данного изобретения концентрация одного из указанных по меньшей мере двух белков, представляющих интерес, может составлять от около 20 мг/мл до около 400 мг/мл. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения в указанных композициях содержится два типа белков, представляющих интерес. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения в указанных композициях содержится три типа белков, представляющих интерес. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения в указанных композициях содержится пять типов белков, представляющих интерес.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанные два или большее число белков, представляющих интерес, содержащихся в указанной композиции, могут быть выбраны из белков-ловушек, белков слияния Fc с химерными рецепторами, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, антител человека, биспецифических антител, мультиспецифических антител, фрагментов антител, нанотел, химер рекомбинантных антител, цитокинов, хемокинов или пептидных гормонов.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция может представлять собой комбинированный фармацевтический состав.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный белок, представляющий интерес, можно очистить из клеток млекопитающих. Указанные клетки млекопитающих могут происходить от человека или происходить не от человека, могут включать в себя первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, эпителиальные клетки шейки матки, эпителиальные клетки бронха, эпителиальные клетки трахеи, эпителиальные клетки почки и эпителиальные клетки сетчатки), установленные клеточные линии и их штаммы (например, эмбриональные клетки почки 293, клетки ВНК, эпителиальные клетки шейки матки HeLa и клетки сетчатки PER-C6, клетки MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки CHO, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Hep-2, клетки KB, клетки LSI80, клетки LS174T, клетки NCI-H-548, клетки RPMI2650, клетки SW-13, клетки T24, клетки WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-1, клетки LLC-MK2, клетки клона М-3, клетки 1-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки LLC-PK1, клетки PK(15), клетки GH1, клетки GH3, клетки L2, клетки LLC-RC 256, клетки MHiCi, клетки XC, клетки MDOK, клетки VSW и клетки TH-1, клетки B1, клетки BSC-1, клетки RAf, клетки RK, клетки PK-15 или их производные), клетки фибробластов из любой ткани или органа (включая, но не ограничиваясь ими, сердце, печень, почку, толстую кишку, кишечник, пищевод, желудок,

нервную ткань (головной, спинной мозг), легкое, сосудистую ткань (артерию, вену, капилляр), лимфоидную ткань (лимфатическую железу, аденоид, миндалину, костный мозг и кровь), селезенку, и фибробласты и фибробласт-подобные клеточные линии (например, клетки CHO, клетки TRG-2, клетки IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки цитруллинемии, клетки Dempsey, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, клетки HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки Midi, клетки CHO, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки Vero, клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T3, клетки F9, клетки SV-T2, клетки M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C3H/10T1/2, клетки HSDMiC3, клетки KLN205, клетки McCoу, L-клетки мыши, клетки штамма 2071 (L-клетки мыши), клетки штамма L-M (L-клетки мыши), L-MTK' (L-клетки мыши), клоны NCTC 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1, клетки Swiss/3T3, клетки индийского мунтжака, клетки SIRC, клетки Cn и клетки Jensen, Sp2/0, NS0, клетки NS1 или их производные).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанная композиция может быть стабильной. Стабильность композиции может включать в себя оценку химической стабильности, физической стабильности или функциональной стабильности активного фармацевтического агента. Фармацевтические составы согласно данному изобретению, как правило, демонстрируют высокие уровни стабильности активного фармацевтического агента.

Что касается белковых фармацевтических составов, термин "стабильный", употребляемый в данном контексте, относится к белку, представляющему интерес, в фармацевтическом составе, способному сохранять приемлемую степень химической структуры или биологической функции после хранения в иллюстративных условиях, определенных в данном документе. Фармацевтический состав может быть стабильным, даже если содержащийся в нем белок, представляющий интерес, не сохраняет 100% своей химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного периода времени. При определенных обстоятельствах сохранение около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% структуры или функции белка после хранения в течение определенного периода времени может рассматриваться как "стабильное".

Стабильность можно измерять, среди прочего, путем определения процентного содержания нативного(ых) белка(ов), которое остается в фармацевтическом составе после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре. Процентное содержание нативного белка можно определять, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру (например, с помощью высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии по размеру [ВЭЖ-ЭХПР, англ. "SE-HPLC"]), при этом "нативный" означает без агрегации и без деградации. При употреблении в контексте данного документа фраза "приемлемая степень стабильности" означает, что в фармацевтическом составе можно выявить по меньшей мере 90% нативной формы белка после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре. В определенных вариантах осуществления данного изобретения в фармацевтическом составе можно выявить по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% нативной формы белка после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре. Определенный период времени, по истечении которого измеряют стабильность, может составлять по меньшей мере 14 суток, по меньшей мере 28 суток, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или больше.

Стабильность можно измерять, среди прочего, путем определения процентного содержания белка, который образуется в агрегате в фармацевтическом составе после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре, при этом стабильность обратно пропорциональна процентному содержанию образующегося агрегата. Данная форма стабильности также указана в данном документе как "коллоидная стабильность". Процентное содержание агрегированного белка можно определять, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру (например, с помощью высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии по размеру [ВЭЖ-ЭХПР]). При употреблении в контексте данного документа фраза "приемлемая степень стабильности" означает, что в фармацевтическом составе можно выявить не больше чем 6% белка в агрегированной форме после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре. В определенных вариантах осуществления данного изобретения приемлемая степень стабильности означает, что в фармацевтическом составе можно выявить не больше чем 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка в агрегированной форме после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре. Определенный период времени, по истечении которого измеряют стабильность, может составлять около по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 28 суток, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или больше. Температура, при которой может храниться фармацевтиче-

ский состав при оценке стабильности, может быть любой температурой от около -80°C до около 45°C , например, хранение при температуре около -80°C , около -30°C , около -20°C , около 0°C , около 4°C , около 5°C , около 25°C , около 35°C , около 37°C или около 45°C . Например, фармацевтический состав можно считать стабильным, если после шести месяцев хранения при температуре 5°C меньше чем около 3%, 2%, 1%, 0,5%, или 0,1% белка выявляют в агрегированной форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после шести месяцев хранения при температуре около 25°C меньше чем около 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, или 0,1% белка выявляют в агрегированной форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 28 суток хранения при температуре 45°C меньше чем около 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, или 0,1% белка выявляют в агрегированной форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после трех месяцев хранения при температуре -20°C , -30°C или -80°C меньше чем около 3%, 2%, 1%, 0,5%, или 0,1% белка выявляют в агрегированной форме.

Стабильность также можно измерять, среди прочего, путем определения процентного содержания белка, который образуется в агрегате в фармацевтическом составе после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре, при этом стабильность обратно пропорциональна процентному содержанию образующегося агрегата. Данная форма стабильности также указана в данном документе как "коллоидная стабильность". Процентное содержание агрегированного белка можно определять, среди прочего, с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру (например, с помощью высокоэффективной жидкостной эксклюзионной хроматографии по размеру [ВЭЖ-ЭХПР]). При употреблении в контексте данного документа фраза "приемлемая степень стабильности" означает, что в фармацевтическом составе можно выявить не больше чем около 6% белка в агрегированной форме после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре. В определенных вариантах осуществления данного изобретения приемлемая степень стабильности означает, что в фармацевтическом составе можно выявить не больше чем 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка в агрегированной форме после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре. Определенный период времени, по истечении которого измеряют стабильность, может составлять около по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 28 суток, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или больше. Температура, при которой может храниться фармацевтический состав при оценке стабильности, может быть любой температурой от около -80°C до около 45°C , например, хранение при температуре около -80°C , около -30°C , около -20°C , около 0°C , около 4°C , около 5°C , около 25°C , около 35°C , около 37°C или около 45°C . Например, фармацевтический состав можно считать стабильным, если после шести месяцев хранения при температуре около 5°C меньше чем около 3%, 2%, 1%, 0,5%, или 0,1% белка выявляют в агрегированной форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после шести месяцев хранения при температуре около 25°C меньше чем около 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, или 0,1% белка выявляют в агрегированной форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после около 28 суток хранения при температуре 45°C меньше чем около 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, или 0,1% белка выявляют в агрегированной форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после трех месяцев хранения при температуре около -20°C , -30°C или -80°C меньше чем около 3%, 2%, 1%, 0,5%, или 0,1% белка выявляют в агрегированной форме.

Стабильность также можно измерять, среди прочего, путем определения процентного содержания белка, который мигрирует в более кислой фракции во время ионного обмена ("кислая форма"), чем в основной фракции белка ("основная зараженная форма"), при этом стабильность обратно пропорциональна содержанию фракции белка в кислой форме. Без ограничения теорией, дезамидирование белка может привести к тому, что белок становится более отрицательно заряженным и, следовательно, более кислым по сравнению с недезамидированным белком (см, например, работу Robinson, N. (2002) "Protein Deamidation" PNAS, 99 (8): 5283-5288). Процентное содержание "кислого" белка можно определять, среди прочего, с помощью ионообменной хроматографии (например, с помощью катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии [КО-ВЭЖХ, англ. "СЕХ-НPLC"]). При употреблении в контексте данного документа фраза "приемлемая степень стабильности" означает, что в фармацевтическом составе можно выявить не больше чем 49% белка в более кислой форме после хранения в течение определенного периода времени при определенной температуре. В определенных иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения приемлемая степень стабильности означает, что в фармацевтическом составе можно выявить не больше чем 49%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка в кислой форме после хранения в течение определенного периода времени при заданной температуре. Определенный период времени, по истечении которого измеряют стабильность, может составлять около по меньшей мере 2 недель, по меньшей мере 28 суток, по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 2 месяца, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 4 месяца, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 7 месяцев, по меньшей мере 8 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев, по меньшей мере 10 месяцев, по меньшей мере 11 месяцев, по меньшей мере 12

месяцев, по меньшей мере 18 месяцев, по меньшей мере 24 месяца или больше.

Температура, при которой может храниться фармацевтический состав при оценке стабильности, может быть любой температурой от около -80°C до около 45°C, например, хранение при температуре около -80°C, около -30°C, около -20°C, около 0°C, около 4°-8°C, около 5°C, около 25°C или около 45°C. Например, фармацевтический состав можно считать стабильным, если после трех месяцев хранения при температуре -80°C, -30°C или -20°C меньше чем около 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка выявляют в более кислой форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после шести месяцев хранения при температуре 5°C меньше чем около 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка находится в более кислой форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после шести месяцев хранения при температуре 25°C меньше чем около 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка находится в более кислой форме. Фармацевтический состав также можно считать стабильным, если после 28 суток хранения при температуре 45°C меньше чем около 9%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% или 0,1% белка можно выявить в более кислой форме.

Для оценки стабильности фармацевтических составов согласно данному изобретению можно применять другие способы, такие как, например, дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК, англ. "DSC") для определения термической стабильности, контролируемое перемешивание для определения механической стабильности и абсорбция при около 350 нм или около 405 нм для определения мутности раствора. Например, фармацевтический состав согласно данному изобретению можно считать стабильным, если после 6 или большего числа месяцев хранения при температуре от около 5°C до около 25°C изменение оптической плотности ОП405 указанного фармацевтического состава составляет меньше чем около 0,05 (например, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 или меньше) от ОП405 указанного фармацевтического состава в нулевой момент времени. Для оценки стабильности также можно применять измерение биологической активности или аффинности связывания белка с его мишенью. Например, фармацевтический состав можно считать стабильным, если после хранения при температуре, например, 5°C, 25°C, 45°C и т.д. в течение определенного периода времени (например, от 1 до 12 месяцев) белок, содержащийся в указанном фармацевтическом составе, связывается со своей мишенью с аффинностью, которая составляет по меньшей мере 90%, 95% или больше от аффинности связывания указанного белка до указанного хранения. Аффинность связывания можно определить, например, с помощью твердофазного иммуоферментного анализа (ТИФА, англ. "ELISA") или плазмонного резонанса. Биологическую активность можно определить с помощью анализа активности белка, такого как, например, приведение клетки, которая экспрессирует указанный белок, в контакт с фармацевтическим составом, содержащим указанный белок. Связывание указанного белка с такой клеткой можно измерить напрямую, например, с помощью анализа методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (англ. "FACS"). В качестве альтернативы, последующую активность белковой системы можно измерить в присутствии белка и сравнить с активностью белковой системы в отсутствие белка.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанную композицию можно применять для лечения, профилактики и (или) облегчения заболевания или нарушения. Неограничивающие примеры заболеваний и нарушений, которые можно лечить и (или) предотвращать введением фармацевтических составов согласно данному изобретению, включают в себя: инфекции; респираторные заболевания; боль, возникающую в результате любого патологического состояния, связанного с нейрогенной, нейропатической или ноцицептивной болью; генетическое нарушение; врожденное нарушение; онкологическое заболевание; герпетическое заболевание; хроническую идиопатическую крапивницу; склеродермию, гипертрофическое рубцевание; болезнь Уиппла; доброкачественную гиперплазию предстательной железы; заболевания легких, такие как легкая, умеренная или тяжелая астма, аллергические реакции; болезнь Кавасаки, серповидно-клеточную анемию; синдром Черга-Стросс; болезнь Грейвса; преэклампсию; синдром Шегрена; аутоиммунный лимфопролиферативный синдром; аутоиммунную гемолитическую анемию; пищевод Барретта; аутоиммунный увеит; туберкулез; нефроз; артрит, включая хронический ревматоидный артрит; воспалительные заболевания кишечника, включая болезнь Крона и язвенный колит; системную красную волчанку; воспалительные заболевания; ВИЧ-инфекцию; СПИД; аферез ЛПНП; нарушения, вызванные мутациями, активирующими пропротеиновую конвертазу субтилизин-кексинового типа (англ. "PCSK9") (усиление функциональных мутаций, УФМ, англ. "GOF"), нарушения, вызванные гетерозиготной семейной гиперхолестеринемией (геСГ, англ. "heFH"); первичную гиперхолестеринемию; дислипидемию; холестатические заболевания печени; нефротический синдром; гипотиреоз; ожирение; атеросклероз; сердечно-сосудистые заболевания; нейродегенеративные заболевания; мультисистемное воспалительное заболевание у новорожденных (англ. "NOM ID/CINCA");

Синдром Макла-Уэллса (СМУ, англ. "MWS"); семейный холодовой аутовоспалительный синдром (СХАС, англ. "FCAS"); семейную средиземноморскую лихорадку (ССЛ, англ. "FMF"); связанный с рецептором фактора некроза опухоли синдром периодической лихорадки (англ. "TRAPS"); ювенильный идиопатический артрит с системным началом (болезнь Стилла); сахарный диабет 1 и 2 типа; аутоиммунные заболевания; заболевания двигательных нейронов; глазные заболевания; заболевания, передающиеся половым путем; туберкулез; заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антагонистом фактора роста сосудистого эндотелия (антагонистом ФРСЭ, англ. "VEGF"); заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается ингибитором белка программируемой гибели клеток PD-1; заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антителом против интерлейкина; заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антителом против фактора роста нервов (антителом против ФРН, англ. "NGF"); заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антителом против PCSK9; заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антителом против ангиопозитин-подобных белков (антителом против АПБ, англ. "ANGPTL"); заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антителом против активина; заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антителом против фактора роста и дифференцировки (антителом против ФРД, англ. "GDF"); заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антителом против белка Fel d1; заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антителом против кластера дифференцировки (антителом против CD); заболевание или патологическое состояние, которое ослабляется, ингибируется или облегчается антителом против компонента комплемента C5, или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанную композицию можно вводить пациенту. Введение можно осуществлять любым путем, приемлемым для специалистов в данной области техники. Неограничивающие пути введения включают в себя пероральный, местный или парентеральный. Введение определенными парентеральными путями может включать в себя введение фармацевтических составов согласно данному изобретению в организм пациента через иглу или катетер с приведением указанных составов в движение стерильным шприцем или каким-либо другим механическим устройством, таким как система непрерывной инфузии. Композицию, представленную в данном изобретении, можно вводить с помощью шприца, инъектора, помпы или любого другого устройства, известного в данной области техники, для парентерального введения. Композицию, представленную в данном изобретении, можно также вводить в виде аэрозоля для абсорбции в легких или полости носа. Указанные композиции можно также вводить для абсорбции через слизистые оболочки, например, при буккальном введении.

При употреблении в контексте данного документа термин "полисорбат" относится к часто используемому эксципиенту, применяемому при разработке фармацевтических составов для защиты антител от различных физических стрессов, таких как перемешивание, процессы замораживания-оттаивания и взаимодействия на поверхности раздела воздух/вода (Emily Ha, Wei Wang & Y. John Wang, Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability, 91 Journal of Pharmaceutical Sciences 2252-2264 (2002); Bruce A. Kerwin, Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways, 97 Journal of Pharmaceutical Sciences 2924-2935 (2008); Hanns-Christian Mahler et al., Adsorption Behavior of a Surfactant and a Monoclonal Antibody to Sterilizing-Grade Filters, 99 Journal of Pharmaceutical Sciences 2620-2627 (2010)), и может включать в себя неионное амфипатическое поверхностно-активное вещество, состоящее из сложных эфиров жирных кислот полиоксиэтилен-сорбитана. Указанные сложные эфиры могут включать в себя головную группу полиоксиэтилен-сорбитана и либо насыщенную монолауратную боковую цепь (полисорбат 20; ПС20), либо ненасыщенную моноолеатную боковую цепь (полисорбат 80; ПС80). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения полисорбат может присутствовать в указанном фармацевтическом составе в диапазоне от 0.001% до 2% (мас./об.). Полисорбат также может содержать смесь различных цепей жирных кислот; например, полисорбат 80 содержит олеиновую, пальмитиновую, миристиновую и стеариновую жирные кислоты, при этом моноолеатная фракция составляет около 58% полидисперсной смеси (Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 Journal of Pharmaceutical Sciences 1657-1666 (2016)). Неограничивающие примеры полисорбатов включают в себя полисорбат-20, полисорбат-40, полисорбат-60, полисорбат-65 и полисорбат-80.

Полисорбат может быть восприимчив к самоокислению в зависимости от pH и температуры, и, кроме того, воздействие ультрафиолетового света также может привести к нестабильности (Ravuri S.k. Kishore et al., Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis, 100 Journal of Pharmaceutical Sciences 721-731 (2011)), в результате чего в растворе образуются свободные жирные кислоты вместе с сорбитановой головной группой. Свободные жирные кислоты, образующиеся из полисорбата, могут включать в себя любые алифатические жирные кислоты с шестью-двадцатью ато-

мами углерода. Неограничивающие примеры свободных жирных кислот включают в себя олеиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, стеариновую кислоту, миристиновую кислоту, лауриновую кислоту или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения полисорбат может образовывать частицы свободных жирных кислот. Размер частиц свободных жирных кислот может составлять по меньшей мере 5 мкм. В дополнение к этому, эти частицы жирных кислот можно классифицировать в соответствии с их размером как видимые (> 100 мкм), суб-видимые (< 100 мкм, которые можно подразделить на микронные (1-100 мкм) и субмикронные (100-1000 нм)) и нанометровые частицы (< 100 нм) (Linda Narhi, Jeremy Schmit & Deepak Sharma, Classification of protein aggregates, 101 Journal of Pharmaceutical Sciences 493-498). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанные частицы жирных кислот могут представлять собой видимые частицы. Видимые частицы можно определить путем визуального осмотра. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанные частицы жирных кислот могут представлять собой суб-видимые частицы. Суб-видимые частицы можно мониторировать с помощью метода световой блокировки в соответствии с Фармакопеей США (англ. "USP").

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения концентрация полисорбата в указанной композиции может составлять около 0,001% мас./об., около 0,002% мас./об., около 0,003% мас./об., около 0,004% мас./об., около 0,005% мас./об., около 0,006% мас./об., около 0,007% мас./об., около 0,008% мас./об., около 0,009% мас./об., около 0,01% мас./об., около 0,011% мас./об., около 0,015% мас./об., около 0,02% мас./об., 0,025% мас./об., около 0,03% мас./об., около 0,035% мас./об., около 0,04% мас./об., около 0,045% мас./об., около 0,05% мас./об., около 0,055% мас./об., около 0,06% мас./об., около 0,065% мас./об., около 0,07% мас./об., около 0,075% мас./об., около 0,08% мас./об., около 0,085% мас./об., около 0,09% мас./об., около 0,095% мас./об., около 0,1% мас./об., около 0,11% мас./об., около 0,115% мас./об., около 0,12% мас./об., около 0,125% мас./об., около 0,13% мас./об., около 0,135% мас./об., около 0,14% мас./об., около 0,145% мас./об., около 0,15% мас./об., около 0,155% мас./об., около 0,16% мас./об., около 0,165% мас./об., около 0,17% мас./об., около 0,175% мас./об., около 0,18% мас./об., около 0,185% мас./об., около 0,19% мас./об., около 0,195% мас./об. или около 0,2% мас./об.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения деградация полисорбата может осуществляться липазой(ами), присутствующей(ими) в указанной композиции. Указанная(ые) липаза(ы) может (могут) представлять собой производственные примеси, которые могут возникать в процессе производства и могут включать в себя три основные категории: происходящие из клеточного субстрата, происходящие из клеточной культуры и образующиеся вследствие последующего воздействия. Примеси, происходящие из клеточного субстрата, включают в себя, но не ограничиваются ими, белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или суммарную ДНК клетки-хозяина). Примеси, происходящие из клеточной культуры, включают в себя, но не ограничиваются ими, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты питательной среды. Примеси, образующиеся вследствие последующего воздействия, включают в себя, но не ограничиваются ими, ферменты, реагенты для химического и биохимического воздействия (например, бромистый циан, гуанидин, окислители и восстановители), неорганические соли (например, тяжелые металлы, мышьяк, неметаллический ион), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие вымываемые вещества.

В одном аспекте данного изобретения указанная липаза может представлять собой серин-гидролазу. В конкретном аспекте данного изобретения указанная липаза может представлять собой белок, подобный карбоксилэстеразе В-1 (A0A061I7X9). В другом конкретном аспекте данного изобретения указанная липаза может представлять собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе 1 (A0A061FE2). В еще одном конкретном аспекте данного изобретения указанная липаза может представлять собой как белок, подобный карбоксилэстеразе В-1, так и белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе 1.

Влияние липаз на деградацию полисорбата идентифицировали с применением способов выявления в соответствии с некоторыми иллюстративными вариантами осуществления данного изобретения.

После идентификации липаз, которые могут осуществлять деградацию полисорбатов в определенных белковых препаратах, было бы чрезвычайно выгодно и желательно иметь реагенты, способы и наборы для специфического, чувствительного и количественного определения и (или) деплеции уровня таких липаз, а также разработать способы получения композиций с низкими уровнями липаз.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлены композиции, которые содержат меньше чем около 5 ppm белка, подобного карбоксилэстеразе В1, и (или) белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения остаточное количество белка, подобного карбоксилэстеразе В-1, и (или) белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1, в указанной композиции может составлять меньше чем около 5 ppm. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения остаточное количество белка, подобного карбоксилэстеразе В-1, и (или) белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1, составляет меньше чем около 0,01 ppm, около 0,02 ppm, около 0,03 ppm, около 0,04 ppm, около 0,05 ppm, около 0,06 ppm, 0,07 ppm, 0,08 ppm,

0,09 ppm, около 0,1 ppm, около 0,2 ppm, около 0,3 ppm, около 0,4 ppm, около 0,5 ppm, около 0,6 ppm, 0,7 ppm, 0,8 ppm, 0,9 ppm, около 1 ppm, около 2 ppm, около 3 ppm, около 4 ppm или около 5 ppm.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения представлены различные способы получения композиции, содержащей белок, представляющий интерес, с содержанием меньше чем около 5 ppm белка, подобного карбоксилэстеразе В-1, и (или) белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1.

В данном изобретении также представлен способ получения композиции, содержащей белок, представляющий интерес, с содержанием меньше чем около 5 ppm белка, подобного карбоксилэстеразе В-1, и (или) белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1, способ, включающий в себя формирование образца с указанным белком, представляющим интерес, и липазой, приведение указанного образца в контакт с зондом, при этом указанный зонд обладает способностью связываться с указанной липазой для образования комплекса, и отделение указанного комплекса от указанного образца.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный образец можно получить на любой стадии биопроцесса, например, жидкость от культуры клеток (ЖКК), собранная жидкость от культуры клеток (СЖКК), образец для квалификации производительности процесса (ОКПП), на любой стадии последующей обработки, например, раствор лекарственного препарата (РЛП) или лекарственный препарат (ЛП), содержащий конечный продукт, составленный в виде фармацевтического состава. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный образец можно получить на любой стадии последующего процесса осветления, хроматографической очистки, вирусной инактивации или фильтрации. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный лекарственный препарат может быть выбран из произведенного лекарственного препарата в клинических условиях, при транспортировке, хранении или обращении с ним. В некоторых других конкретных иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный лекарственный препарат может содержать полисорбат(ы).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ получения композиции, содержащей белок, представляющий интерес, с содержанием меньше чем около 5 ppm белка, подобного карбоксилэстеразе В-1, и (или) белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1, может также включать в себя дополнительные хроматографические стадии.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения способ получения композиции, содержащей белок, представляющий интерес, и меньше чем около 5 ppm белка, подобного карбоксилэстеразе В-1, и (или) белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1, может дополнительно включать в себя фильтрацию одного или всех из следующего: образца, элюата из одной или большего числа хроматографических стадий и (или) элюента из одной или большего числа хроматографических стадий.

При употреблении в контексте данного документа термин "вирусная фильтрация" может включать в себя фильтрацию с использованием подходящих фильтров, включая, но не ограничиваясь ими, Planova 20N™, 50 N или BioEx от Asahi Kasei Pharma, фильтры Viresolve™ от EMD Millipore, ViroSart CPV от Sartorius или фильтры Ultipor DV20 либо DV50™ от Pall Corporation. Рядовому специалисту в данной области техники будет очевидно, как выбрать подходящий фильтр для получения желаемых характеристик фильтрации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения способ получения композиции, содержащей белок, представляющий интерес, и меньше чем около 5 ppm белка, подобного карбоксилэстеразе В-1, и (или) белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1, может дополнительно включать в себя выполнение УФ/ДФ одного или всех из следующего: образца, элюата из одной или большего числа хроматографических стадий и (или) элюента из одной или большего числа хроматографических стадий.

При употреблении в контексте данного документа термин "ультрафильтрация", или "УФ", может включать в себя процесс мембранной фильтрации, аналогичный обратному осмосу, с использованием гидростатического давления для проталкивания воды через полупроницаемую мембрану. Ультрафильтрация подробно описана в работе Leos J. Zeman & Andrew L. Zydney, *Microfiltration and ultrafiltration: principles and applications* (1996). Для ультрафильтрации можно применять фильтры с размером пор меньше чем 0,1 мкм. При применении фильтров, имеющих такой малый размер пор, можно снизить объем образца за счет пропуска буфера для образца через фильтр, в то время как антитела удерживаются за фильтром.

При употреблении в контексте данного документа термин "диафильтрация", или "ДФ", может включать в себя способ применения ультрафильтров для удаления и обмена солей, сахаров и неводных растворителей, для отделения свободных частиц от связанных частиц, для удаления низкомолекулярного материала и (или) для быстрого изменения ионной среды и (или) pH-условий среды. Растворенные микровещества удаляются наиболее эффективно путем добавления растворителя к ультрафильтруемому раствору со скоростью, приблизительно равной скорости ультрафильтрации. Это вымывает микрофрагменты из раствора в постоянном объеме, эффективно производя удерживаемое антитело. В определенных

вариантах осуществления данного изобретения стадию диафильтрации можно использовать для замены различных буферов, используемых в связи с данным изобретением, необязательно - перед дальнейшей хроматографией или другими стадиями очистки, а также для удаления примесей из препарата антител.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный зонд может обладать способностью связываться с твердой подложкой. Указанная твердая подложка может представлять собой любую из хорошо известных подложек или матриц, которые в настоящее время широко используются или предлагаются для иммобилизации, разделения и т.д. Они могут принимать форму частиц, листов, гелей, фильтров, мембран, волокон, капилляров или микротитровальных полосок, пробирок, планшетов или лунок и т.д. Удобная подложка может быть изготовлена из стекла, кремния, латекса или полимерного материала. Дисперсные материалы, например, гранулы, как правило, являются предпочтительными из-за их большей связывающей способности, что особенно касается полимерных гранул. Твердая подложка в виде частиц, используемая согласно данному изобретению, содержит сферические гранулы. Немагнитные полимерные гранулы, пригодные для использования в способе согласно данному изобретению, выпускаются компанией Dyno Particles AS (г. Лиллестрем, Норвегия), а также компаниями Qiagen, Pharmacia и Serotec.

Однако для облегчения манипулирования и разделения предпочтительны магнитные гранулы. При употреблении в контексте данного документа термин "магнитный" означает, что подложка способна иметь магнитный момент, передаваемый ей при помещении в магнитное поле, и, таким образом, может перемещаться под действием этого поля. Другими словами, подложка, содержащая магнитные частицы, может быть легко удалена путем магнитной агрегации, что обеспечивает быстрый, простой и эффективный способ разделения частиц после стадии связывания нуклеиновых кислот и является гораздо менее жестким способом, чем традиционные методики, такие как центрифугирование, создающие силы сдвига, которые могут разрушать нуклеиновые кислоты. Следовательно, применяя способ согласно данному изобретению, комплекс, образовавшийся между зондом и липазой, можно удалить путем приложения магнитного поля, например, с помощью постоянного магнита. Как правило, достаточно приложить магнит к стенке сосуда, содержащего смесь образца, чтобы частицы присоединились к указанной стенке сосуда, и вылить оставшуюся часть образца. В некоторых конкретных аспектах данного изобретения можно применять суперпарамагнитные частицы, например, описанные компанией Sintef в патентном документе EP-A-106873, поскольку можно избежать магнитной агрегации и слипания частиц во время реакции, обеспечивая тем самым равномерную экстракцию нуклеиновых кислот. Хорошо известные магнитные частицы, продаваемые компанией Dynal AS (г. Осло, Норвегия) как DYNABEADS, особенно подходят для применения в данном изобретении. Кроме того, можно получить гранулы или другие подложки, имеющие различные типы функционализированной поверхности, например, положительно заряженные или гидрофобные. Было показано, что хорошо работают слабо и сильно положительно заряженные поверхности, слабо отрицательно заряженные нейтральные поверхности и гидрофобные поверхности, например, с полиуретановым покрытием.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный зонд может обладать способностью связываться с твердой подложкой с помощью лиганда. Неограничивающие примеры могут включать в себя индикатор, молекулу биотина, модифицированную молекулу биотина, модифицированную молекулу биотина, модифицированную молекулу биотина, нуклеиновую кислоту, последовательность белка, метку эпитопа, молекулу с низким содержанием электронов или молекулу с высоким содержанием электронов. Конкретные примеры лигандов могут включать в себя, но не ограничиваться ими, молекулу биотина или модифицированную, такую как молекула дезиминобиотина, молекулу дестиобиотина, вицинальные диолы, такие как 1,2-дигидроксиэтан, 1,2-дигидроксициклогексан и т.д., диоксигенин, мальтозу, олигогистидин, глутатион, 2,4-динитробензол, фениларсенат, одноцепочечную ДНК (одДНК, англ. "ssDNA"), двухцепочечную ДНК (дцДНК, англ. "dsDNA"), пептид или полипептид, хелат металла, сахарид, родамин или флуоресцеин, или любой гаптен, к которому можно получить антитело. Примеры лигандов и реагентов для их захвата включают в себя следующие, но не ограничиваются ими: дестиобиотин или структурно модифицированные реагенты на основе биотина, включая молекулу дезиминобиотина, модифицированную молекулу биотина, которые связываются с белками семейства авидин/стрептавидин, которые могут, например, применяться в формах стрептавидин - агароза, олигомерный авидин - агароза или мономерный авидин - агароза; любой 1,2-диол, такой как 1,2-дигидроксиэтан ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), и другие 1,2-дигидроксиалканы, включая циклические алканы, например 1,2-дигидроксициклогексан, которые связываются с алкил- или арилбороновой кислотой или сложными эфирами бороновой кислоты, такими как фенил- $\text{B}(\text{OH})_2$ или гексил- $\text{B}(\text{O}-\text{этил})_2$, которые могут быть присоединены через алкильную или арильную группу к твердому материалу-подложке, такому как агароза; мальтоза, которая связывается с мальтозосвязывающим белком (а также с любой другой парой сахар/сахар-связывающий белок или, более широко, с любой парой лиганд/лиганд-связывающий белок, которая имеет свойства, рассмотренные выше); гаптен, такой как динитрофенильная группа, для любого антитела, при этом указанный гаптен связывается с антителом против гаптена, которое распознает указанный гаптен, например, динитрофенильная группа будет связываться с антидинитрофенил-IgG; лиганд, который связывается с переходным металлом, например, олигомерный гистидин будет связываться с

Ni(II), реагент для улавливания переходного металла может применяться в форме связанного смолой хелатированного переходного металла, такого как Ni(II), хелатированный нитрилтриуксусной кислотой, или Ni(II), хелатированный иминдиуксусной кислотой; глутатион, который связывается с глутатион-S-трансферазой.

В данном изобретении также представлен способ выявления белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе 1, или белка, подобного печеночной карбоксилэстеразе B-1, в образце путем приведения указанного образца в контакт с серин-гидролазным зондом. В одном аспекте данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может включать в себя приведение указанного образца в контакт с серин-гидролазным зондом и их совместную инкубацию для образования комплекса липазы с указанным серин-гидролазным зондом. В другом аспекте данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может включать в себя отфильтровывание серин-гидролазного зонда, который не образует указанный комплекс липазы с указанным серин-гидролазным зондом.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может дополнительно включать в себя приведение указанного образца в контакт с магнитными гранулами, обладающими способностью связываться с указанным серин-гидролазным зондом, так, чтобы указанные магнитные гранулы связались с указанным комплексом липазы с указанным серин-гидролазным зондом.

В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанные магнитные гранулы, связанные с указанным комплексом липазы с указанным серин-гидролазным зондом, можно далее извлекать из указанного образца и промывать буфером.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может дополнительно включать в себя извлечение указанных магнитных гранул, которые связаны с указанным комплексом липазы с указанным серин-гидролазным зондом, с образованием раствора, обогащенного липазами.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может дополнительно включать в себя добавление гидролизующего агента к указанному раствору для получения продуктов расщепления.

При употреблении в контексте данного документа термин "гидролизующий агент" относится к любому одному или комбинации большого числа различных агентов, которые могут осуществлять расщепление белка. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают в себя протеазу из *Aspergillus Saitoi*, эластазу, субтилизин, протеазу XIII, пепсин, трипсин, Ттур-N, хомотрипсин, аспергиллопепсин I, протеазу LysN (Lys-N), эндопротеиназу LysC (Lys-C), эндопротеиназу Asp-N (Asp-N), эндопротеиназу Arg-C (Arg-C), эндопротеиназу Glu-C (Glu-C) или белок внешней мембраны T (БВМТ, англ. "OmpT"), фермент, осуществляющий деградацию иммуноглобулинов, из *Streptococcus pyogenes* (ФДИС, англ. "IdeS"), термолизин, папаин, проназу, протеазу V8 или их биологически активные фрагменты или гомологи, или их комбинации. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают в себя использование высокой температуры, микроволновой печи, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения, растворителей (неограничивающими примерами являются этанол и ацетонитрил), расщепления иммобилизованным ферментом (РИФ, англ. "IMER"), ферментов, иммобилизованных на магнитных частицах, и ферментов, иммобилизованных на чипе. Недавний обзор, в котором обсуждаются доступные способы расщепления белка, см. в работе Switazar et al., "Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments" (Linda Switazar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments, 12 Journal of Proteome Research 1067-1077 (2013)). Один гидролизующий агент или их комбинация могут расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде специфичным относительно последовательности образом, создавая предсказуемый набор более коротких пептидов.

Соотношение гидролизующего агента и липазы, и время, необходимое для расщепления, можно выбирать соответствующим образом для получения расщепления липазы. Когда соотношение фермента и субстрата является неподходяще высоким, соответствующая высокая скорость расщепления не обеспечит достаточного времени для анализа пептидов с помощью масс-спектрометра, и охват последовательности будет нарушен. С другой стороны, низкое соотношение фермента и субстрата (Ф/С) требует большей продолжительности расщепления и, следовательно, длительного времени сбора данных. Соотношение фермента и субстрата может варьировать от около 1:0,5 до около 1:200. При употреблении в контексте данного документа термин "расщепление" относится к гидролизу одной или большего числа пептидных связей белка. Существует несколько подходов к осуществлению расщепления белка в образце с использованием соответствующего гидролизующего агента, например, ферментативное расщепление или неферментативное расщепление.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может дополнительно включать в себя добавление в указанный раствор белок-денатурирующего агента.

При употреблении в контексте данного документа "денатурирование белка" может относиться к

процессу, при котором трехмерная форма молекулы изменяется по сравнению с ее нативным состоянием без разрыва пептидных связей. Денатурацию белка можно проводить с использованием белок-денатурирующего агента. Неограничивающие примеры белок-денатурирующих агентов включают в себя нагревание, высокий или низкий pH, или воздействие хаотропных агентов. Ряд хаотропных агентов можно применять в качестве белок-денатурирующих агентов. Хаотропные растворенные вещества увеличивают энтропию системы, вмешиваясь во внутримолекулярные взаимодействия, опосредованные нековалентными силами, такими как водородные связи, силы ван-дер-Ваальса и гидрофобные эффекты. Неограничивающие примеры хаотропных агентов включают в себя бутанол, этанол, хлорид гуанидиния, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину, N-лауроилсаркозин, мочевины и их соли. В конкретном аспекте данного изобретения указанный белок-денатурирующий агент может представлять собой мочевины.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может дополнительно включать в себя добавление в указанный раствор белок-денатурирующего или белок-восстанавливающего агента.

При употреблении в контексте данного документа термин "белок-восстанавливающий агент" относится к агенту, используемому для восстановления дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающие примеры белок-восстанавливающих агентов, используемых для восстановления белка, представляют собой дитиотреитол (ДТТ, англ. "DTT"), β -меркаптоэтанол, реагент Элмана, гидрохлорид гидроксилamina, цианборгидрид натрия, гидрохлорид трис(2-карбокsetил)фосфина (ТКЭФ-НСl, англ. "TCSEPHCl") или их комбинации. В одном аспекте данного изобретения указанный белок-восстанавливающий агент может представлять собой ДТТ.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может дополнительно включать в себя добавление в указанный раствор белок-алкилирующего агента.

При употреблении в контексте данного документа термин "белок-алкилирующий агент" относится к агенту, используемому для алкилирования определенных свободных аминокислотных остатков в белке. Неограничивающие примеры белок-алкилирующих агентов представляют собой иодацетамид (ИАА, англ. "IOA"), хлорацетамид (ХАА, англ. "CAA"), акриламид (АА), N-этилmaleимид (ЭМ, англ. "NEM"), метилметантиосульфонат (ММТС, англ. "MMTS") и 4-винилпиридин или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный способ выявления липазы в образце может дополнительно включать в себя анализ указанных продуктов расщепления для выявления указанных липаз. В одном аспекте данного изобретения указанные продукты расщепления можно анализировать с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте данного изобретения указанный масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом конкретном аспекте данного изобретения указанный масс-спектрометр может быть сопряжен с системой жидкостной хроматографии. В еще одном конкретном аспекте данного изобретения указанный масс-спектрометр может быть сопряжен с системой жидкостной хроматографии и мониторинга множественных реакций.

При употреблении в контексте данного документа термин "масс-спектрометр" включает в себя устройство, способное идентифицировать конкретные молекулярные фрагменты и измерить их точные массы. Данный термин предназначен включать в себя любой молекулярный детектор, в который может быть элюирован полипептид или пептид для выявления и (или) характеристики. Масс-спектрометр может включать в себя три основных части: источник ионов, массовый анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Анализируемые атомы, молекулы или кластеры можно переносить в газовую фазу и ионизировать одновременно (как в ионизации электрораспылением) или посредством отдельных процессов. Выбор источника ионов в значительной степени зависит от применения.

При употреблении в контексте данного документа термин "tandemная масс-спектрометрия" включает в себя метод, при котором получают структурную информацию о молекулах образца с использованием множественных стадий отбора по массе и разделения по массе. Необходимым условием является возможность перевода молекул в газовую фазу и их ионизации без повреждения, и возможность индуцировать их распад некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массе. Многоступенчатую MS/MS, или MSⁿ, можно выполнять путем первоначального выбора и выделения иона-предшественника (MS²), его фрагментации, выделения первичного фрагмента иона (MS³), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (MS⁴) и так далее до тех пор, пока можно получить значимую информацию или пока выявляется сигнал от фрагмента иона. Tandemные MS успешно выполняются с использованием широкого спектра комбинаций анализаторов. Выбор анализаторов для конкретного применения может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размером, стоимостью и доступностью. Две основные категории методов tandemной MS представляют собой методы tandemной MS с разрешением в пространстве и методы tandemной MS с разрешением во времени, но существуют также гибридные методы, в которых анализаторы tandemной MS с разрешением во времени соединены в пространстве или с анализаторами

тандемной МС с разрешением в пространстве. Тандемный масс-спектрометр с разрешением в пространстве содержит источник ионов, устройство активации ионов-предшественников и по меньшей мере два масс-анализатора без захвата. Можно сконфигурировать конкретные функции разделения по m/z так, что ионы отбираются в одной части устройства и диссоциируют в промежуточной части устройства, а образовавшиеся в результате ионы затем передаются в другой анализатор для разделения по m/z и сбора данных. В масс-спектрометре с разрешением во времени ионы, образующиеся в источнике ионов, могут улавливаться, выделяться, фрагментироваться и разделяться по m/z в одном и том же физическом устройстве.

Пептиды, идентифицированные с помощью масс-спектрометра, можно использовать в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно применять для характеристики белков путем коррелирования экспериментальных и теоретических данных от МС/МС, при этом последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Указанная характеристика включает в себя, но не ограничивается ими, секвенирование аминокислот из фрагментов белка, определение последовательности белка, определение последовательности белка *de novo*, определение местоположения посттрансляционных модификаций или идентификацию посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

При употреблении в контексте данного документа термин "база данных" относится к биоинформационным инструментам, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров МС-МС по всем возможным последовательностям в базе(ах) данных. Неограничивающие примеры таких инструментов представляют собой ресурсы Mascot (<http://www.matrixscience.com>), Spectrum Mill (<http://www.chem.agilent.com>), PLGS (<http://www.waters.com>), PEAKS (<http://www.bioinformaticsolutions.com>), Proteinpilot (<http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot>), Phenyx (<http://www.phenyx-ms.com>), Sorcerer (<http://www.sagenresearch.com>), OMSSA (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/>), X!Tandem (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>), Protein Prospector (<http://www.prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>) или Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный масс-спектрометр может быть сопряжен с системой жидкостной хроматографии.

При употреблении в контексте данного документа термин "хроматография" относится к процессу, в котором химическую смесь, переносимую жидкостью или газом, можно разделить на компоненты в результате дифференциального распределения химических соединений по мере их протекания вокруг или поверх неподвижных жидкой или твердой фаз. Неограничивающие примеры хроматографии включают в себя классическую обращенно-фазовую (ОФ), ионообменную (ИО) и нормально-фазовую (НФ) хроматографии. В отличие от ОФ-, НФ- и ИО-хроматографий, в которых гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие и ионное взаимодействие, соответственно, являются доминирующими режимами взаимодействия, в смешанной хроматографии можно применять комбинацию двух или большего числа из указанных режимов взаимодействия. С масс-спектрометром можно применять несколько типов жидкостной хроматографии, таких как жидкостная хроматография с быстрым разрешением (ЖХБР, англ. "RRLC"), сверхэффективная жидкостная хроматография (СЭЖХ, англ. "UPLC"), сверхбыстрая жидкостная хроматография (СБЖХ, англ. "UFLC") и нано-жидкостная хроматография (нЖХ, англ. "nLC"). Для получения более подробной информации о способе и принципах хроматографии см. работу Colin et al. (Colin F. Poole et al., *Liquid chromatography fundamentals and instrumentation* (2017)).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный масс-спектрометр может быть сопряжен с системой нано-жидкостной хроматографии. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения подвижная фаза, используемая для элюирования белка при жидкостной хроматографии, может представлять собой подвижную фазу, которая может быть совместима с масс-спектрометром. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанная подвижная фаза может представлять собой ацетат аммония, бикарбонат аммония или формиат аммония, или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный масс-спектрометр может быть сопряжен с системой жидкостной хроматографии и мониторинга множественных реакций.

При употреблении в контексте данного документа термин "мониторинг множественных реакций", или "ММР", относится к методике, основанной на масс-спектрометрии, которая позволяет осуществлять точное количественное определение малых молекул, пептидов и белков в сложных матрицах с высокой чувствительностью, специфичностью и широким динамическим диапазоном (Paola Picotti & Ruedi Aebersold, *Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions*, 9 *Nature Methods* 555-566 (2012)). Как правило, ММР можно выполнять с помощью трехквadrupольных масс-спектрометров, в которых ион-предшественник, соответствующий выбранному малым молекулам/пептидам, выбирают в первом квадруполе, а фрагмент-ион иона-предшественника выбирают для мониторинга в третьем квадруполе (Yong Seok Choi et al., *Targeted human cerebrospinal fluid proteomics for the validation of multiple Alzheimer's disease biomarker candidates*, 930 *Journal of Chromatography B* 129-

135 (2013)).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного изобретения указанный масс-спектрометр может быть сопряжен с системой жидкостной хроматографии и мониторинга выбранных реакций.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается ни одной (ни одним) из вышеперечисленных хроматографических смол, эксципиентов, способов фильтрации, гидролизующих агентов, белок-денатурирующих агентов, белок-алкилирующих агентов, инструментов, используемых для идентификации, и любую/любой (любые) хроматографическую(ие) смолу(ы), эксципиент(ы), способ(ы) фильтрации, гидролизующий агент(ы), белок-денатурирующий агент(ы), белок-алкилирующий агент(ы), инструмент(ы), используемый(е) для идентификации, можно выбрать любым подходящим способом.

В данном документе цитируются различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих цитируемых ссылок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

Ниже следующие примеры представлены для более полного понимания данного изобретения. Тем не менее, их не следует рассматривать как ограничивающие объем данного изобретения каким-либо образом.

Примеры

Материалы

Гранулы Dynabeads MyOne Streptavidin T1 были приобретены у Invitrogen от Thermo Fisher Scientific (г. Уолтем, штат Массачусетс, США). Серин-гидролазный зонд дестиобиотин-ФФ ActivX, муравьиная кислота, ацетонитрил, дитиотреитол (ДТТ) и раствор тетраметилбензидина (ТМБ, англ. "ТМБ" для 1-шагового блоттинга были приобретены у Thermo Fisher Scientific (г. Уолтем, штат Массачусетс, США). Уксусная кислота, 10-кратный трис-буферный солевой раствор (ТБС), иодацетамид (ИАА), бычий сывороточный альбумин (БСА) и мочевины были приобретены у Sigma-Aldrich (г. Сент-Луис, штат Миссури, США). HEPES-забуференный солевой раствор с ЭДТА и 0,005% об./об. сурфактант P-20 (HBS-EP) были приобретены у GE (г. Бостон, штат Массачусетс, США). Лекарственная субстанция с моноклональными антителами была произведена компанией Regeneron Pharmaceutical Inc. Полисорбат 80 был приобретен у Croda (Восточный Йоркшир, Великобритания). Печеночная эстераза кролика (ПЭК, англ. "rLE") была приобретена у Sigma Aldrich (г. Сент-Луис, штат Миссури, США). КЭС-1 человека была приобретена у Abscam (г. Кембридж, Великобритания). Модифицированный трипсин степени чистоты "для секвенирования" был приобретен у Promega (г. Мадисон, штат Висконсин, США). Колонка Oasis Max (2,1×20 мм, 30 мкм) и колонка Acquity UPLC VEN C4 (2,1×50 мм, 1,7 мкм) были приобретены у Waters (г. Милфорд, штат Массачусетс, США). Аналитическая колонка Acclaim PepMap 100 C18 (0,075×250 мм, 3 мкм) и колонка-ловушка Acclaim PepMap 100 C18 (0,075×20 мм, 3 мкм) были приобретены у Thermo Fisher Scientific (г. Уолтем, штат Массачусетс, США). 10-кратный фосфатно-солевой буфер Дульбекко (ФСБД, англ. "DPBS") был приобретен у Gibco (Thermo Fisher Scientific, г. Уолтем, штат Массачусетс, США), а Твин-20 был приобретен у J.T. Baker (г. Филлипсберг, штат Нью-Джерси, США). Q-Exactiv Plus с источником ионизации электрораспылением (ИЭР, англ. "ESI") был приобретен у Thermo Fisher Scientific (г. Уолтем, штат Массачусетс, США).

Анализ деградации полисорбата способом двухмерной жидкостной хроматографии с детекцией заряженного аэрозоля (ДЗА)/ масс-спектрометрии (МС)

Деградацию ПС20 и ПС80 в бесклеточной среде СНО или антитела в фармацевтическом составе анализировали методом двухмерной ВЭЖХ-ДЗА/МС, как описано ранее Genentech (Yi Li et al., Characterization and Stability Study of Polysorbate 20 in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulation by Multidimensional Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Charged Aerosol Detection-Mass Spectrometry, 86 Analytical Chemistry 5150-5157 (2014)). Сначала полисорбаты отделяли от фармацевтического состава МАТ с помощью колонки Oasis MAX (2,1×20 мм, 30 мкм), предварительно уравновешенной 99% растворителя А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и 1% растворителя В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле). После введения образца градиент равновесия поддерживали в течение 1 мин с последующим линейным повышением содержания растворителя В до 15% в течение 4 мин для отделения полисорбата от МАТ. Затем элюированные полисорбаты направляли на колонку Acquity VEN C4 (2,1×50 мм, 1,7 мкм) с помощью переключающего клапана для разделения на основе обращенно-фазовой хроматографии. В начале разделения быстро повышали содержание растворителя В до 20% за 1,5 мин, затем постепенно повышали до 99% к 45 минутам и выдерживали в течение 5 мин, после чего проводили стадию уравновешивания с 1% растворителя В в течение 5 мин. Скорость потока поддерживали на уровне 0,1 мл/мин, а температуру колонки - на уровне 40°C.

Систему двухмерной ЖХ обеспечивали с помощью Thermo UltiMate 3000 и соединяли с ДЗА-детектором Corona Ultra CAD, работающим при давлении азота в 75 фунтов на квадратный дюйм для количественного определения. Для управления указанной системой и анализа данных использовали Chromeleon 7. Q-Exactiv Plus с источником ИЭР был сопряжен с системой двухмерной ЖХ только для

характеризации. Указанное устройство работало в положительном режиме при напряжении капилляра, равном 3,8 кВ, температуре капилляра, равной 350°C, скорости обжимного потока, равной 40, и скорости вспомогательного потока, равной 10. Полные спектры сканирования собирали в диапазоне m/z , равном 150-2000. Для сбора и анализа данных МС использовали программное обеспечение Thermo Xcalibur.

Площадь пика каждого сложного эфира определяли по хроматограмме с ДЗА и суммировали для учета интактного ПС80. Оставшийся после деградации процент ПС80 рассчитывали путем сравнения суммы площадей пиков сложного моноэфира, элюированного между 25 и 30 мин в каждый момент времени, с суммой площадей пиков в нулевой момент времени. Относительный процент сложных эфиров различного порядка или общих сложных эфиров может быть рассчитан аналогичным образом.

Анализ деградации ПС80 с КЭС-1 человека, ПЭС кролика и фармацевтическим составом антитела

Влияние карбоксилэстеразы 1 (КЭС-1) человека и печеночной эстеразы (ПЭС, англ. "LES") кролика на ПС80 исследовали путем смешивания 2 мкл 0,1 мг/мл КЭС-1 человека или 0,02 мг/мл ПЭС кролика с 2 мкл 1% ПС80 в 16 мкл 10 мМ гистидинового буфера, pH 6,0, с последующей инкубацией при температуре 4°C в течение 1,5, 8 и 18 ч, соответственно. Одну аликвоту (3 мкл) каждого раствора разбавляли в 25 раз путем добавления 72 мкл 10 мМ гистидина, pH 6,0, перед анализом способом ЖХ-ДЗА.

Гидролиз ПС80 в фармацевтическом составе мАт исследовали путем смешивания 18 мкл 50 мг/мл мАт (буферный обмен на 10 мМ гистидин, pH 6,0) с 2 мкл 1% ПС80 и последующей инкубации при температуре 5°C в течение 18, 24 и 36 ч. Одну аликвоту (3 мкл) каждого раствора разбавляли 25 раз в 10 мМ гистидине, pH 6,0, перед анализом способом ЖХ-ДЗА.

Ингибирование липаз антителами, происходящими из СНО

Серин-гидролазный зонд дестиобиотин-ФФ ActivX разбавляли в ДМСО до концентрации 0,1 мМ с получением исходного раствора. Аликвоты объемом 1,25 мкл, 5 мкл и 20 мкл исходного раствора зонда смешивали с 5 мг мАт в 1-кратном фосфатно-солевом буфере (ФСБ, англ. "PBS") в конечном объеме 1 мл, после чего осторожно вращали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем в каждой смеси выполняли буферный обмен на 10 мМ гистидин, pH 6,0, для удаления свободных зондов и доводили концентрацию мАт до 50 мг/мл. Каждый образец после буферного обмена инкубировали с 0,1% ПС80 при температуре 5°C с последующим анализом деградации ПС80 способом ЖХ-ДЗА.

Деплеция липаз из антител, происходящих из СНО

Эксперимент по деплеции липаз выполняли с использованием иммобилизованного серин-гидролазного зонда дестиобиотин-ФФ ActivX. Для иммобилизации указанного зонда 35 мкл серин-гидролазного зонда ActivX дестиобиотин-ФФ (0,1 мМ исходный раствор в ДМСО) сначала связывали с 2 мг стрептавидиновых гранул Dynabeads до конечного объема 1 мл в 1-кратном ФСБ путем мягкого вращения при комнатной температуре в течение 2 ч. Технологический контрольный образец получали путем смешивания 35 мкл ДМСО с 2 мг стрептавидиновых гранул Dynabeads до конечного объема 1 мл в 1-кратном ФСБ и мягкого вращения при комнатной температуре в течение 2 ч. Указанные гранулы промывали 3 раза в 1-кратном ФСБ, а затем повторно суспендировали в 800 мкл 1-кратного ФСБ. Затем к указанному стрептавидиновым гранулам Dynabeads, соединенным с зондом ФФ, добавляли 5 мг образца мАт и инкубировали при комнатной температуре с мягким вращением в течение 1 ч. В надосадочной жидкости выполняли буферный обмен на 10 мМ гистидин, pH 6,0, и доводили концентрацию мАт до 50 мг/мл. Затем образцы надосадочной жидкости после буферного обмена инкубировали с 0,1% ПС80 при температуре 5°C с последующим анализом деградации ПС80 способом ЖХ-ДЗА.

Выявление белков клетки-хозяина (БКХ) в антителах, происходящих из СНО, с помощью основанного на активности профилирования белков (ОАПБ, англ. "ABPP")

Серин-гидролазный зонд дестиобиотин-ФФ ActivX разбавляли в ДМСО до концентрации 0,1 мМ с получением исходного раствора. Аликвоту объемом 20 мкл исходного раствора зонда сначала смешивали с 5 мг мАт в 1-кратном ФСБ в конечном объеме 1 мл, после чего осторожно вращали при комнатной температуре в течение 1 ч. Свободные зонды удаляли фильтрованием, а белок извлекали с помощью 5 М мочевины в ФСБ. К раствору добавляли 2 мг стрептавидиновых гранул Dynabeads и инкубировали при мягком вращении при комнатной температуре в течение 2 ч. После удаления надосадочной жидкости гранулы Dynabeads собирали с помощью магнита и промывали с помощью 5 М мочевины в ФСБ, а затем повторно суспендировали в 5 М мочевины/50 мМ растворе Трис с 5 мМ ТКЭФ. Белки денатурировали и восстанавливали при температуре 55°C в течение 30 мин, а затем инкубировали с 10 мМ иодацетамидом в течение 30 минут в темноте. Алкилированные белки разбавляли в 5 раз и расщепляли с помощью 1 мкг трипсина при температуре 37°C в течение ночи. Гранулы Dynabeads удаляли магнитом, а надосадочную жидкость со смесью пептидов подкисляли с помощью 5 мкл 10% МК, обессоливали с помощью обессоливающего наконечника GL-Tip™ SDB (GL science, Япония) и повторно суспендировали в 40 мкл 0,1% МК. 15 мкл переносили в эппендорф-пробирки для анализа способом нано-ЖХ-МС/МС, а остальной объем хранили при температуре -80°C. Образцы для отрицательного контроля получали путем первоначального нагревания образца мАт при температуре 80°C в течение 5 мин для денатурации всех белков, чтобы предотвратить связывание белков клетки-хозяина с серин-гидролазным зондом дестиобиотин-ФФ ActivX.

Анализ способом ЖХ-МС/МС

Смесь пептидов растворяли в 40 мкл 0,1% муравьиной кислоты (МК) и сначала загружали 10 мкл в колонку-ловушку Acclaim PepMap 100 C18 размером 20 см × 0,075 мм (Thermo Fisher Scientific) для обессоливания, а затем разделяли на аналитической колонке Acclaim PepMap 100 C18 размером 250 мм × 0,075 мм в системе UltiMate 3000 nanoLC (Thermo Fisher Scientific). Подвижную фазу А готовили из 0,1% МК в сверхчистой воде, а подвижную фазу В готовили из 0,1% МК в 80% ацетонитриле (АЦН). Пептиды разделяли в 150-минутном линейном градиенте 2-32% буфера В при скорости потока 300 нл/мин. UltiMate 3000 nanoLC был соединен с масс-спектрометром Q-Exactive HFX (Thermo Fisher Scientific). Указанный масс-спектрометр работал в режиме, зависящем от данных, в котором 10 наиболее интенсивных ионов подвергались фрагментации с помощью диссоциации при столкновении с более высокой энергией (англ. "HCD") с нормализованной энергией столкновения (НЭС, англ. "NCE"), равной 27%, AGC, равным 3e6, максимальным временем впрыска, равным 60 мс, для каждого полного сканирования MS (от m/z, равного 375-1500, с разрешением, равным 120000) и с AGC, равным 1e5, максимальным временем впрыска, равным 60 мс, для событий MS/MS (от m/z, равного 200-2000, с разрешением, равным 30000).

Прямое расщепление мАт-1

100 мкг мАт-1 высушивали в скоростном вакууме, затем повторно растворяли в 20 мкл 8 М мочевины, содержащей 10 мМ ДТТ. Белок денатурировали и восстанавливали при температуре 55°C в течение 30 мин, а затем инкубировали с 6 мкл 50 мг/мл иодацетамида в течение 30 мин в темноте. Алкилированный белок расщепляли с помощью 100 мкл 0,1 мкг/мкл трипсина при температуре 37°C в течение ночи. Пептидную смесь подкисляли с помощью 5 мкл 10% трифторуксусной кислоты (ТФК, англ. "TFA"). Образец разбавляли до 0,4 мкг/мкл и вводили 2 мкл в колонку для анализа способом ЖХ-МС/МС.

МПР-анализ КЭС-B1L и КЭС-1L в мАт-1

Образцы расщепленной смеси (0,8 мкг) напрямую загружали в колонку-ловушку Acclaim PepMap 100 C18 размером 20 см × 0,075 мм (Thermo Fisher Scientific) для обессоливания, а затем разделяли на аналитической колонке Acclaim PepMap 100 C18 размером 250 мм × 0,075 мм в системе UltiMate 3000 nanoLC (Thermo Fisher Scientific). Колонку предварительно уравнивали 98% подвижной фазы А (приготовленной из 0,1% муравьиной кислоты в воде) и 2% подвижной фазы В (приготовленной из 0,1% муравьиной кислоты в 80% АЦН) при скорости потока в 300 нл/мин. После введения образца в течение 100 минут применяли линейный градиент от 2% до 37% подвижной фазы В для разделения пептидов. Данные масс-спектрометрии получали с помощью мониторинга параллельных реакций (МПР, англ. "PRM"), нацеленных на 3 пептида - LNVQGDTK [m/z 437,7351²⁺], AISESGVILVPGLFTK [m/z 815,9744²⁺] и ENHAFVPTVLDGVLLPK [m/z 925,0145²⁺] - из КЭС-1L, 3 пептида - APEEILAEK [m/z 500,2715²⁺], DGASEEETNLSK [m/z 640,2861²⁺] и IRDGVLDILGDLTFGIPSVIVSR [m/z 819,1355³⁺] - из КЭС-B1L, и 3 пептида - GPSVFPLAPCSR [644,3293²⁺], LLIYDASNRPTGIPAR [586,3283³⁺] и STSESTAALGCLVK [712,3585²⁺] - из мАт-1. Во всех экспериментах полный масс-спектр с разрешением в 120000 относительно m/z 200 (цель AGC: 1e6, максимальное время впрыска: 60 мс, m/z: 350-2000) сопровождался МПР-сканированием по расписанию с разрешением в 30000 (цель AGC: 1e5, максимальное время впрыска: 100 мс). Применяли диссоциацию при столкновении с более высокой энергией (англ. "HCD") с нормализованной энергией столкновения в 27 эВ и окном изоляции в 2 m/z для анализа методом МС/МС.

Пример 1. Выявление полисорбата в фармацевтическом составе мАт с помощью двухмерной ЖХ-ДЗА/МС

Полисорбаты из фармацевтических составов мАт отделяли, идентифицировали и количественно определяли с помощью двухмерной ЖХ-ДЗА/МС, следуя немного модифицированному способу согласно Yi Li et al., см. выше, и Oleg V. Borisov et al., Toward Understanding Molecular Heterogeneity of Polysorbates by Application of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with Computer-Aided Data Analysis, 83 Analytical Chemistry 3934-3942 (2011). Для удаления мАт применяли колонку Oasis Max в первом измерении ЖХ, а для разделения оставшихся ПОЭ и сложных эфиров ПОЭ на основе их содержания и типа жирных кислот применяли обращенно-фазовую хроматографию во втором измерении. Фрагменты ПС80 элюировали в следующем порядке: ПОЭ, ПОЭ-изосорбид, ПОЭ-сорбитан, сложные моноэфиры, диэфиры, триэфиры и тетраэфиры (фиг. 1, панель справа). Структуру каждого сложного эфира выясняли с помощью масс-спектрометрии на основе химической формулы полимера и иона диоксоланилия, образовавшегося в результате фрагментации в источнике. На фиг. 1 панель А справа представляет собой репрезентативную хроматограмму полного ионного тока (ПИТ) ПС80 с главными пиками, обозначенными в порядке элюирования: ПОЭ - ПОЭ-изосорбид - ПОЭ-сорбитан, ПОЭ-сорбитан-моноолеат, ПОЭ-сорбитан-моноолеат, ПОЭ-изосорбид-моноолеат и ПОЭ-моноолеат, ПОЭ-сорбитан-линолеат/сложный диэфир олеата, ПОЭ-сорбитан-диолеат, ПОЭ-изосорбид-диолеат и ПОЭ-диолеат, вероятно, ПОЭ-изосорбид/ПОЭ-линолеат/сложный диэфир олеата, и смесь триолеата и тетраолеата ПОЭ-сорбитана. Следует отметить, что пик 8 на фиг. 1 был обозначен как возможная смесь ПОЭ-изосорбида/ПОЭ-линолеата/сложного диэфира олеата, поскольку его масс-спектры были слишком сложными для интерпретации. Количественное определение полисорбатов осуществляли с помощью хроматографического анализа с детекцией заряженного аэрозоля (ДЗА) (фиг. 1, панель В справа).

Пример 2. Быстрая деградация ПС80 в фармацевтическом составе мАт-1

Быстрая деградация ПС80 в мАт-1 наблюдалась при хранении при температуре 5°C в течение 36 ч. Значительное снижение наблюдалось в пиках, элюируемых между 25 и 30 мин, представляющих сложные моноэфиры ПОЭ, т.е. ПОЭ-сорбитан-моноолеат, ПОЭ-сорбитан-диолеат, ПОЭ-изосорбид-моноолеат и ПОЭ-диолеат, в то время как элюирование ПОЭ между 10 и 18 мин выявило значительное повышение (фиг. 2). Не было никаких изменений в сложных ди-, три- и тетраэфирах ПОЭ, элюируемых между 32-45 минутами. Этот уникальный паттерн деградации предполагает, что, вероятнее всего, за деградацию ПС80 отвечает одно семейство липаз/эстераз. Это семейство гидролаз может осуществлять деградацию только сложную моноэфирную часть ПС80, оставляя нетронутыми сложные эфиры более высокого порядка. Если бы в деградации был задействован больше чем один тип гидролазы, паттерн деградации был бы более сложным.

Пример 3. Ингибирование липаз дестиобиотин-фторфосфонатным (ФФ) зондом приводит к устранению деградации ПС80

Поскольку большинство липаз, которые, как сообщалось, осуществляют деградацию полисорбатов, принадлежат к семейству серин-гидролаз, авторы данного изобретения выполнили эксперименты по ингибированию с использованием зонда ФФ. Данный эксперимент позволяет идентифицировать и отличить ферментативно активные гидролазы от других неактивных гидролаз либо в их зимогенной форме, либо с эндогенными ингибиторами. Обоснование данного эксперимента заключается в том, что если присутствует какая-либо активная серин-гидролаза, добавление ее ингибитора остановит функционирование фермента, в данном случае - деградацию ПС80. Зонд дестиобиотин-ФФ является одним из коммерчески доступных серин-гидролазных зондов, которые содержат реакционноспособную фторфосфонатную группу, которая образует ковалентную связь с Ser в каталитическом центре гидролазы серинового типа и блокирует ее ферментативную активность. Данный эксперимент по ингибированию ясно продемонстрировал, что при добавлении всего лишь 0,125 мкм зонда ФФ ферментативная активность полностью прекращалась (фиг. 3). Данный эксперимент также продемонстрировал, что в исследованном фармацевтическом составе лекарственного препарата присутствует только липаза серинового типа, поскольку зонд дестиобиотин-ФФ специфичен в отношении серин-гидролазы.

Пример 4. Деpletion липаз дестиобиотин-фторфосфонатным (ФФ) зондом приводит к снижению деградации ПС80 в фармацевтическом составе мАт

Затем авторы данного изобретения выполняли деплецию липаз с помощью иммобилизованного серин-гидролазного зонда ФФ ActivX. Биотиновая часть зонда может быть захвачена и иммобилизована на стрептавидиновой поверхности, что позволяет концентрировать и очищать захваченные серин-гидролазы. Схема эксперимента по деплеции служит двум целям: 1) если деградация ПС80 вызвана липазой(ами), принадлежащей(ими) к семейству серин-гидролаз, деплеция приведет к снижению деградации ПС80; 2) липазу(ы), захваченную(ые) зондом дестиобиотин-ФФ, можно далее идентифицировать с помощью масс-спектрометрического анализа.

Данный эксперимент по деплеции выполняли так, как описано в разделе "Материалы и методы", со схемой деплеции мАт, представленной на фиг. 4. Зонд дестиобиотин-ФФ связывали со стрептавидиновыми гранулами Dynabeads для деплеции липаз. Как показано на фиг. 5, до деплеции липазы около 44,7% деградации сложных моноэфиров ПС80 в мАт-1 наблюдалось после 18-часовой инкубации при температуре 5°C. Дополнительная 18-часовая инкубация привела к полной потере сложных моноэфиров ПС80. После деплеции липазы наблюдалось меньше чем 8% деградации ПС80 как после 18 ч, так и после 36 ч инкубации. Результаты данного эксперимента по деплеции указывают на то, что липаза(ы), которая(ые) вызывала(ли) деградацию ПС80 в мАт-1, была(и) удалена(ы) зондом дестиобиотин-ФФ. Чтобы убедиться, что именно зонд, а не магнитные стрептавидиновые гранулы взаимодействовали с липазами, в данные эксперименты был включен контрольный технологический образец. Указанный контрольный технологический образец получали путем смешивания мАт-1 только с магнитными стрептавидиновыми гранулами, без добавления зонда дестиобиотин-ФФ. Около 29% и 86% деградации ПС80 в мАт-1 наблюдалось после 18 ч и 36 ч инкубации при температуре 5°C, соответственно, что указывает на наличие определенных неспецифических взаимодействий между липазами и магнитными гранулами. По сравнению с зондом ФФ, липазы, удаляемой посредством неспецифических взаимодействий, было значительно меньше, поэтому большая часть липазы была удалена путем специфического связывания между иммобилизованным зондом ФФ и липазой.

Пример 5. Печеночные карбоксилэстеразы идентифицировали во фракции мАт-1, сконцентрированной с помощью зонда ФФ

Белки клетки-хозяина, захваченные зондом дестиобиотин-ФФ, подвергали расщеплению трипсином и масс-спектрометрическому анализу так, как описано в разделе "Материалы и методы". Среди 15 идентифицированных белков клетки-хозяина (табл. 1) карбоксилэстеразы КЭС-B1L (англ. "CES-B1L") и КЭС-1L (англ. "CES-1L") были идентифицированы впервые. Путем сравнения с денатурированным контрольным образцом (табл. 2) был сделан вывод, что оба белка были захвачены путем специфического связывания с зондом ФФ. КЭС-1L идентифицировали только в активной форме, но не в денатурированной форме, что позволяет предположить, что указанная карбоксилэстераза была биологически активна в

мАт-1. КЭС-В1L идентифицировали в активной форме с 13 уникальными пептидами, в то время как только 2 уникальных пептида были в денатурированных формах, что предполагает, что небольшое количество белка КЭС-В1L было способно неспецифически связываться с магнитными гранулами, и данные результаты согласуются с результатами контрольного технологического образца в эксперименте по деплации (фиг. 5). Тем не менее, гораздо большее число уникальных пептидов, идентифицированных в активных формах, позволяет предположить, что КЭС-В1L также ответственна за деградацию ПС80. Что касается других идентифицированных белков клетки-хозяина, большинство из них можно легко определить как неактивные ферменты, поскольку они выявлялись в обоих условиях с одинаковым числом уникальных пептидов, например, белок, подобный куллину 9, и церулоплазмин. Анионный трипсин-2 идентифицировали в мАт-1 в активной форме, поскольку он также является серин-протеазой, однако его можно исключить из-за его функции протеазы, не имеющей отношения к деградации ПС80. Два других совместно захваченных белка, актин и аннексин, также можно исключить из процесса деградации ПС80 из-за отсутствия у них ферментативных функций.

Для определения содержания новых идентифицированных липаз, КЭС-В1L и КЭС-1L, проводили анализ способом МПР. Концентрации КЭС-В1L и КЭС-1L были определены как 9,6 и 9,0 частей на миллион, соответственно. Относительно низкое содержание двух указанных липаз позволяет предположить их сильную ферментативную активность в отношении деградации ПС80.

Таблица 1

Белок клетки-хозяина, сконцентрированный с помощью зонда ФФ, идентифицированный в нативном мАт-1

Белок в мАт-1 (нативном)	Учетный №	Число уникальных пептидов
Белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе В-1	A0A061I7X9	13
Белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе 1	A0A061IFE2	7
Пероксиредоксин-1	Q9JKY1	7
Белок, подобный куллину 9	A0A061IMU7	7
Соединительный плакоглобин	G3HLU9	6
Транстиретин	G3I4M9	6
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	A0A061IDP2	3
Церулоплазмин	A0A061INJ7	3
Аннексин	G3IG05	3
Анионный трипсин-2	G3HL18	3
Белок, связывающий витамин D	G3IHJ6	3
Белок, подобный рибосомальному белку S27a убиквитина 40S	A0A061IQ58	3
Белок, подобный десмоколлину 2	A0A061IEG0	2
Рецептор тирозинпротеинкиназы	G3HG67	2
Актин, гладкая мускулатура аорты	G3HQY2	2

Таблица 2

Белок клетки-хозяина, сконцентрированный с помощью зонда ФФ, идентифицированный в денатурированном мАт-1

Белок в мАт-1 (денатурированном)	Учетный №	Число уникальных пептидов
Белок, подобный куллину 9	A0A061IMU7	7
Транстиретин	G3I4M9	4
Белок, подобный рибосомальному белку S27a убиквитина 40S	A0A061IQ58	3
Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	A0A061IDP2	3
Пероксиредоксин-1	Q9JKY1	3
Белок, связывающий витамин D	G3IHJ6	3
Церулоплазмин	A0A061INJ7	2
Рецептор тирозинпротеинкиназы	G3HG67	2
Белок, подобный десмоколлину 2	A0A061IEG0	2
Белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе В-1	A0A061I7X9	2
Соединительный плакоглобин	G3HLU9	1

Пример 6. Паттерн деградации ПС80 с печеночной карбоксилэстеразой 1 человека и печеночной эстеразой кролика

Одной из распространенных и важных практик в анализе БКХ является проверка функции активности липазы. Указанные эксперименты по ингибированию и деплеции предоставили убедительные доказательства того, что КЭС-В1L и КЭС-1L, вероятнее всего, являются липазами, ответственными за деградацию ПС80. Однако, учитывая, что используемый зонд ФФ специфичен не в отношении одного белка, а в отношении семейства белков, возможно, что другая(ие) липаза(ы), представленная(ые) в исследованном лекарственном препарате, также может (могут) играть роль в пути деградации. Эксперимент со специальным добавлением может обеспечить необходимую валидацию того, являются ли предполагаемые липазы основной причиной деградации ПС80. Если специально добавленная липаза может вызвать точно такой же паттерн деградации, что и эндогенная липаза, то идентифицированная липаза может быть подтверждена в качестве ключевого элемента для деградации ПС. Такое подтверждение обычно затруднено из-за отсутствия доступных активных липаз. Чтобы дополнительно подтвердить роль двух указанных новых идентифицированных липаз, осуществили поиск в BLAST. Результаты поиска показали, что коммерчески доступные печеночная эстераза кролика и печеночная карбоксилэстераза 1 человека функционально схожи, причем каждая из них имеет гомологию последовательности в 56,0% и в 69,7% с первым сегментом КЭС-В1L и КЭС-1L, соответственно (фиг. 6D). Как печеночную карбоксилэстеразу 1 человека, так и печеночную эстеразу кролика выбрали для сравнения паттерна деградации ПС80 в мАт-1. На фиг. 6 представлено, что печеночные эстеразы человека и кролика демонстрируют паттерн деградации, эквивалентный тому, что показан для мАт-1 (фиг. 6, А-С). Во всех трех образцах компонентами ПС80, проходящими быструю деградацию, были сложные моноэфир, которые элюировали между 25 и 30 мин, в то время как сложные ди-, три- и тетраэфир, которые элюировали после 32 мин, оставались неизменными. Данные эксперименты по характеристике паттернов деградации с использованием известных липаз подтвердили, что КЭС-В1L и КЭС-1L ответственны за деградацию ПС80 в мАт-1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ деплеции липазы из образца, включающий в себя:
 - приведение образца, содержащего, по меньшей мере, одну липазу, в контакт с зондом, при этом указанный зонд обладает способностью связываться с указанной липазой с образованием комплекса; и
 - отделение указанного комплекса от указанного образца, тем самым осуществляя деплецию указанной липазы из указанного образца,
 - где указанный зонд предпочтительно связывается с ферментативно активной липазой.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный образец содержит белок, представляющий интерес.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный образец содержит полисорбатный эксципиент.
4. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный полисорбатный эксципиент выбран из полисорбата-20, полисорбата-60, полисорбата-80 или их комбинаций.
5. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе В1.
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе 1.
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный зонд обладает способностью связываться с твердой подложкой.
8. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанный зонд прикреплен к твердой подложке с помощью лиганда.
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что указанный лиганд может представлять собой индикатор, молекулу биотина, модифицированную молекулу биотина, нуклеиновую кислоту, последовательность, эпитопную метку, молекулу с низким содержанием электронов или молекулу с высоким содержанием электронов.
10. Способ по п.1, дополнительно включающий в себя извлечение, по меньшей мере, одного фрагмента указанной липазы из указанного комплекса.
11. Способ очистки образца, содержащего белок, представляющий интерес, и липазу, включающий в себя:
 - приведение образца, содержащего белок, представляющий интерес и, по меньшей мере, одну липазу, в контакт с зондом, при этом указанный зонд обладает способностью связываться с указанной липазой с образованием комплекса; и
 - отделение указанного комплекса от указанного образца, тем самым очищая указанный белок, представляющий интерес, в указанном образце,
 - где указанный зонд предпочтительно связывается с ферментативно активной липазой.
12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный образец содержит полисорбатный эксципиент.
13. Способ по п.12, отличающийся тем, что указанный полисорбатный эксципиент выбран из полисорбата-20, полисорбата-60, полисорбата-80 или их комбинаций.

14. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе В1.

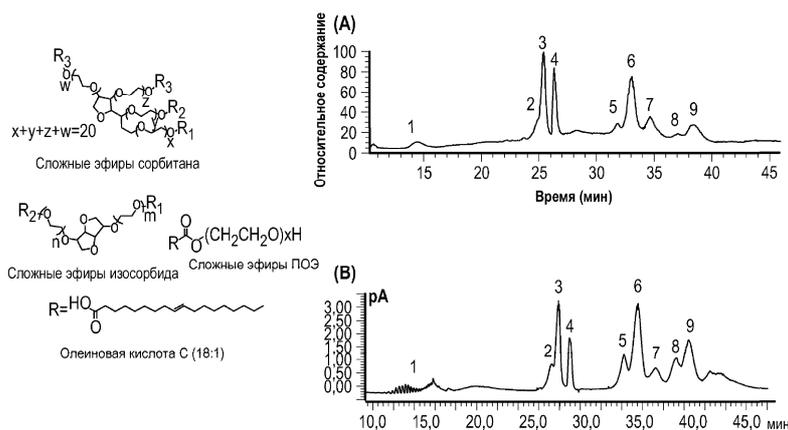
15. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанная липаза представляет собой белок, подобный печеночной карбоксилэстеразе 1.

16. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный зонд обладает способностью связываться с твердой подложкой.

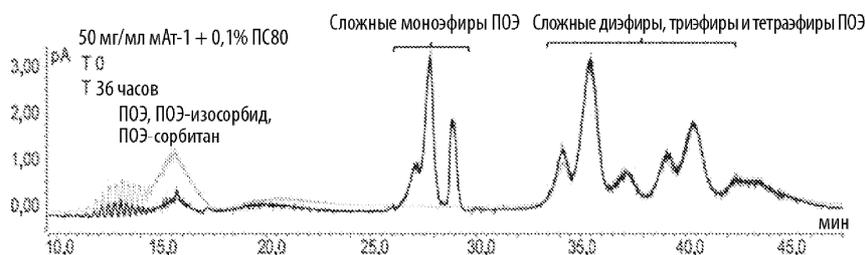
17. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанный зонд прикреплен к твердой подложке с помощью лиганда.

18. Способ по п.17, отличающийся тем, что указанный лиганд может представлять собой индикатор, молекулу биотина, модифицированную молекулу биотина, нуклеиновую кислоту, последовательность, эпитопную метку, молекулу с низким содержанием электронов или молекулу с высоким содержанием электронов.

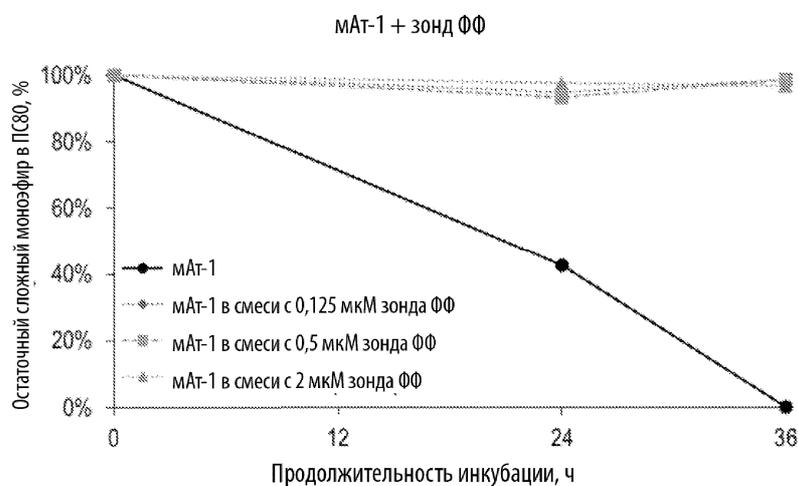
19. Способ по п.11, дополнительно включающий в себя извлечение, по меньшей мере, одного фрагмента указанной липазы из указанного комплекса.



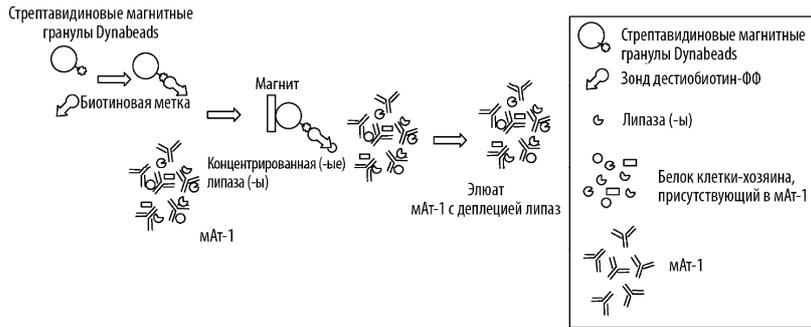
Фиг. 1



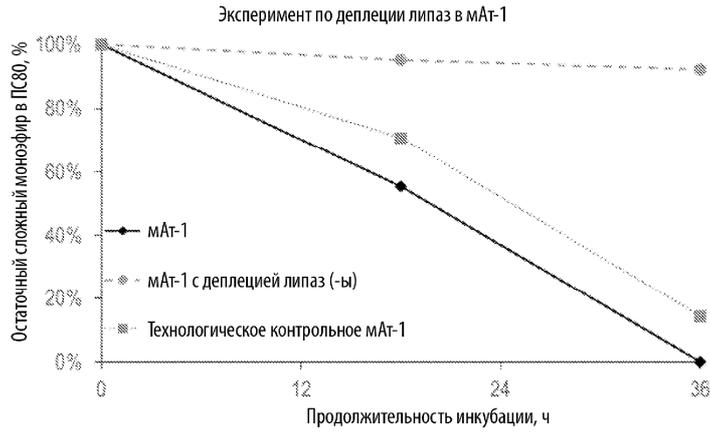
Фиг. 2



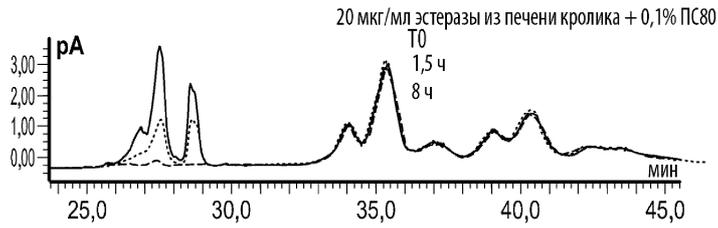
Фиг. 3



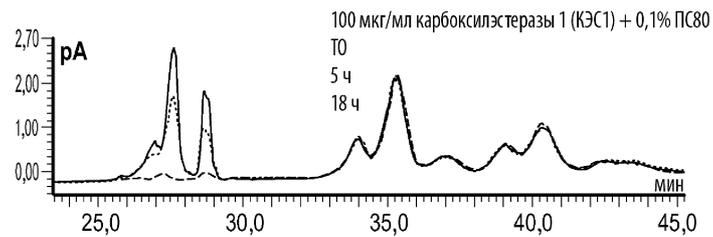
Фиг. 4



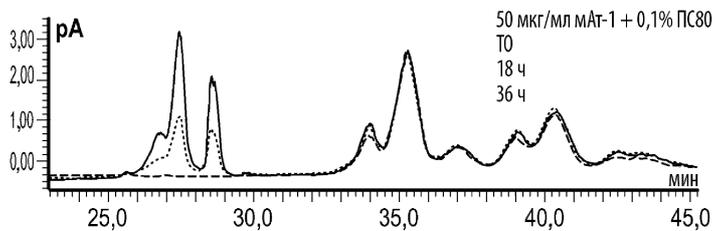
Фиг. 5



Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 6С

