

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046617**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.03.29**

(51) Int. Cl. **G01N 1/40 (2006.01)**  
**G01N 33/68 (2006.01)**

(21) Номер заявки  
**202293488**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.06.07**

---

(54) **ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ**

---

(31) **63/036,679**

(56) US-A1-20180106815  
WO-A1-2018189557  
US-A1-20120315645  
US-A1-20160103137  
US-A1-20120074308  
US-A1-20200225199

(32) **2020.06.09**

(33) **US**

(43) **2023.02.17**

(86) **PCT/US2021/036170**

(87) **WO 2021/252357 2021.12.16**

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

(72) Изобретатель:  
**Янь Юэтянь, Ванг Шунхай (US)**

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

---

(57) Предлагаются способы количественного определения целевого белка в образце, не предусматривающие использование жидкостной хроматографии. Один вариант реализации изобретения относится к способу количественного определения целевых антител в образце, не предусматривающему использование жидкостной хроматографии, включающему этапы добавления в образец меченого антитела в качестве внутреннего стандарта, расщепления антител в образце с образованием пептидов, фракционирования пептидов; и количественного определения целевых антител, используя MS<sup>2</sup>-систему с прямым вводом, содержащую одну или несколько ионных ловушек и два или более квадрупольных масс-анализаторов и источник ионизации электрораспылением, причем способ не предусматривает использование жидкостной хроматографии.

**B1**

**046617**

**046617**

**B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка заявляет преимущество и приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 63/036,679, поданной 9 июля 2020 года, которая включена в полном объеме посредством ссылки.

### **Область техники**

Изобретение в целом относится к системам и способам количественного определения антител.

### **Перечень последовательностей**

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII, и он включен в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 2 июня 2021 года, имеет название 064752\_032PCT1\_SL.txt, и ее размер составляет 622 байта.

### **Уровень техники изобретения**

При разработке терапевтических средств на основе антител надежный способ количественного определения молекул лекарственного средства в образцах сыворотки/плазмы крови животных является крайне важным для обеспечения проведения токсикокинетических и фармакокинетических исследований. Жидкостную хроматографию в сочетании с методами tandemной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) все чаще используют для количественного определения терапевтических пептидов и белков в сложных биологических средах благодаря ее преимуществам в отношении времени разработки способа, специфичности, избирательности, реализуемости мультиплексирования и широкого динамического диапазона, по сравнению с анализами связывания лиганда (LBA). Однако стандартные анализы с использованием LC-MS зачастую имеют недостаток в виде низкой производительности, например, используя LC-MS в сутки может быть обработано лишь 100 образцов.

Следовательно, целью изобретения является обеспечение более эффективных и чувствительных систем и способов количественного определения моноклональных антител (mAb) человека в образце.

Еще одной целью изобретения является обеспечение систем и способов, с помощью которых можно количественно определять концентрацию белка более чем в 100 образцах в сутки.

### **Сущность изобретения**

Предлагаются способы количественного определения целевого белка в образце, не предусматривающие использование жидкостной хроматографии. Один вариант реализации изобретения относится к способу количественного определения целевых антител в образце, не предусматривающему использование жидкостной хроматографии, включающему этапы добавления в образец меченого антитела в качестве внутреннего стандарта, расщепления антител в образце с образованием пептидов, фракционирования пептидов; и количественного определения целевых антител с использованием MS<sup>2</sup>-системы с прямым вводом, содержащей одну или несколько ионных ловушек и два или более квадрупольных масс-анализаторов и источник ионизации электрораспылением, причем способ не предусматривает использование жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает этап добавления к пептидам меченого пептида Fc VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO:1) перед фракционированием. В одном варианте реализации изобретения пептиды фракционируют с помощью твердофазной экстракции с обращенной фазой. Меченое антитело в качестве внутреннего стандарта и меченый пептид Fc являются мечеными, как правило, тяжелым изотопом. В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелый изотоп выбран из группы, состоящей из <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N и <sup>2</sup>H. В одном варианте реализации изобретения целевое антитело представляет собой моноклональное антитело человека.

Еще один вариант реализации изобретения относится к способу количественного определения лекарственного препарата белковой природы в биологическом образце, включающему этапы добавления в образец известного количества меченого тяжелым изотопом пептида в качестве стандарта, имеющего аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:1, расщепления лекарственного препарата белковой природы в образце на пептиды, фракционирования пептидов в условиях, которые обеспечивают сохранение пептидов, имеющих аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:1, анализа образца, содержащего пептиды лекарственного препарата белковой природы и пептиды в качестве стандартов, в отношении присутствия пептида, имеющего аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:1, используя MS<sup>2</sup>-систему для калибровки указанной системы, причем MS<sup>2</sup>-система содержит одну или несколько ионных ловушек и два или более квадрупольных масс-анализаторов и источник ионизации электрораспылением, и определения количества присутствующего в образце лекарственного препарата белковой природы исходя из наличия пептида, причем в способе не используется жидкостная хроматография. Лекарственный препарат белковой природы может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок. В некоторых вариантах реализации изобретения данные для количественного определения ионов лекарственного препарата и ионов меченого масс-спектрометрической меткой пептида в качестве стандарта собирают при разных MS<sup>2</sup>-сканированиях. Как описано выше, пептиды фракционируют с использованием твердофазной экстракции с обращенной фазой с использованием 15-25% ацетонитрила в качестве промывки и элюции 20-30% ацетонитрилом. В одном варианте реализации изобретения используют промывку 20% ацетонитрилом и элюцию 24% ацетонитрилом.

В одном варианте реализации изобретения способ дополнительно включает этап добавления в образец с лекарственным препаратом белковой природы меченного тяжелым изотопом лекарственного препарата белковой природы перед расщеплением образца.

В некоторых вариантах реализации изобретения образец содержит кровь или сыворотку крови. Кровь или сыворотка крови может принадлежать человеку или отличному от человека животному. В одном варианте реализации изобретения сыворотка крови представляет собой сыворотку крови обезьяны.

В одном варианте реализации изобретения описанные способы имеют динамический диапазон от 1 до 1000 мкг/мл и нижним пределом количественного обнаружения (LLOQ) 1-2 мкг/мл.

Еще в одном варианте реализации изобретения описанные способы являются автоматизированными высокопроизводительными способами.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 представляет собой схематическое изображение рабочего процесса иллюстративного способа, описанного в данном документе.

Фиг. 2А-2С представляют собой схемы, на которых показан рабочий процесс иллюстративных способов, описанных в данном документе.

Фиг. 3А-3F представляют собой иллюстративные графики, на которых показаны результаты последовательного сканирования в режиме отслеживания параллельных реакций (PRM) эндогенных пептидов и пептидов в качестве внутреннего стандарта (IST).

Фиг. 4А-4С представляют собой иллюстративные графики, на которых показано совместное изолирование в широком диапазоне эндогенных и IST-пептидов для PRM.

Фиг. 5А-5Е представляют собой иллюстративные графики, на которых показано сканирование в режиме 2-плексного PRM.

Фиг. 6А представляет собой масс-спектр у14++ эндогенного и добавленного пептида, полученный с использованием PRM с изолированием в широком диапазоне при концентрации 1 мкг/мл. Фиг. 6В представляет собой масс-спектр у14++ эндогенного и добавленного пептида, полученный с использованием 2-плексного PRM при концентрации 1 мкг/мл.

Фиг. 7А представляет собой таблицу, в которой представлены ионы-продукты, результаты тестирования которых приведены на фигурах 7В-7D. Фиг. 7В-7Е представляют собой масс-спектры эндогенных и добавленных ионов-продуктов у8+ и у14++ в холостых пробах или образцах с 10 мкг/мл представляющего интерес mAb.

Фиг. 8А представляет собой схематическое изображение элюции в ступенчатом градиенте ацетонитрила (ACN) из иллюстративного способа, описанного в данном документе. Фиг. 8В представляет собой график, на котором показано процентное распределение пептида VVSV по значениям ступенчатого градиента ACN. Фиг. 8С представляет собой график, на котором показана интенсивность для пептида VVSV с использованием разных окон элюции с помощью ACN (промывка 18%, элюция 24%; промывка 18%, элюция 26%; промывка 20%, элюция 24%; промывка 20%, элюция 26%).

Фиг. 9А-9В представляют собой масс-спектры, на которых показана относительная распространенность иона-продукта у14++ в планшете с сорбентом Oasis для SPE, с промывкой 18% ACN и элюцией 24% ACN (фиг. 9А), и в планшете с сорбентом Strata X для SPE, с промывкой 20% ACN и элюцией 24% ACN.

Фиг. 10А-10В представляют собой калибровочные кривые, на которых показана интенсивность сигнала, соответствующего меченному тяжелым изотопом пептиду, в зависимости от различных концентраций меченного тяжелым изотопом пептида. Данные были аппроксимированы с использованием линейной регрессионной модели с весовым коэффициентом 1/х.

Фиг. 11А-11В представляют собой калибровочные кривые, на которых показан нормализованный ответ в зависимости от различных концентраций белка для образцов с добавлением меченного тяжелым изотопом mAb в качестве внутреннего стандарта. Данные были аппроксимированы с использованием линейной регрессионной модели с весовым коэффициентом 1/х.

Фиг. 12 представляет собой таблицу, в которой представлены результаты анализа образцов для QC, используя описанные способы для выявления концентрации антитела.

Фигуры 13А-13В представляют собой масс-спектры, на которых показана относительная распространенность эндогенных и SIL-пептидов в сыворотке крови в качестве холостой пробы (фиг. 13А) и в сыворотке крови+mAb в качестве внутреннего стандарта (фиг. 13В).

Фиг. 14 представляет собой таблицу, в которой представлены результаты определения LLOQ с использованием разных серий сыворотки крови обезьяны.

Фиг. 15А-15В представляют собой калибровочные кривые, на которых показаны относительный ответ (фиг. 15А) и интенсивность (фиг. 15В) в зависимости от различных концентраций mAb1 в сыворотке крови обезьяны. Фиг. 15С представляет собой таблицу, в которой представлены результаты анализа образцов для QC.

Фиг. 16 представляет собой столбчатый график, на котором показано, что увеличение объема промывки улучшает LLOQ. По оси X представлен объем промывки, а по оси Y представлен ответ при концентрации 1 мкг/мл mAb/холостая проба.

## Подробное описание сущности изобретения

### I. Определения.

Следует понимать, что данное описание не ограничивается описанными в данном документе композициями и способами, а также описанными условиями экспериментов, поскольку они могут варьироваться. Также следует понимать, что применяемая в данном документе терминология предназначена только для описания определенных вариантов реализации изобретения и не предназначена для ограничения, поскольку объем данного описания будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все применяемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в области, к которой относится данное описание. Тем не менее для реализации на практике или проверки данного изобретения можно использовать любые композиции, способы и материалы, подобные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе. Все упоминаемые в данном документе публикации включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Применение слов в единственном числе в контексте описания данного изобретения (в особенности в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если в данном документе не указано иное или если указанное явно не противоречит контексту.

Подразумевается, что в данном документе описание диапазонов значений служит лишь в качестве сокращенного способа индивидуального указания каждого отдельного значения, подпадающего под диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в данное описание изобретения, как если бы оно было отдельно описано в данном документе.

Применение термина "около" предназначено для описания значений выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл.  $\pm 10\%$ ; в других вариантах реализации изобретения значения могут варьироваться выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл.  $\pm 5\%$ ; в других вариантах реализации изобретения значения могут варьироваться выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл.  $\pm 2\%$ ; в других вариантах реализации изобретения значения могут варьироваться выше или ниже указанного значения в диапазоне прибл.  $\pm 1\%$ . Вышеуказанные диапазоны предназначены для разъяснения контекста, и никаких дополнительных ограничений не подразумевается. Все описанные в данном документе способы можно осуществлять в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или это явно не противоречит контексту. Применение всех возможных примеров или уточняющих слов (например, "такой как"), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшей иллюстрации данного изобретения, и не является ограничением объема данного изобретения, если не заявлено иное. Никакая из формулировок в данном описании не должна истолковываться как указание какого-либо незаявленного элемента, необходимого для осуществления данного изобретения на практике.

Термин "белок" относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатков, соединенных друг с другом посредством пептидной связи. Белок включает полипептиды и пептиды, и он может также включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, и при этом белки включают, среди прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки получают с использованием различных типов рекомбинантных клеточек, используя хорошо известные способы культивирования клеточек, и в целом их вводят в клетку с помощью методов генетической инженерии (как, например, в виде последовательности, кодирующей химерный белок, или кодон-оптимизированной последовательности, лишенной интронов последовательности и т.д.), где кодирующие их последовательности могут находиться в виде эписомы или могут быть интегрированы в геном клеточки.

"Антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). VH- и VL-области дополнительно могут быть подразделены на гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных, от аминоконца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает ссылку как на гликозилированные, так и негликозилированные иммуноглобулины любого изоформа или подкласса. Термин "антитело" включает молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также вклю-

чает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться более чем с одним отличающимся эпитопом. Биспецифические антитела в общих чертах описаны в заявке на выдачу патента США № 8586713, которая включена в данную заявку посредством ссылки.

"Fc-слитые белки" содержат часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые в природе не встречаются вместе. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями происходящих из антитела полипептидов (включая Fc-домен), описано, например, Rath, T., et al., *Crit Rev Biotech*, 35(2): 235-254 (2015), Levin, D., et al., *Trends Biotechnol*, 33(1): 27-34 (2015)). "Рецепторные Fc-слитые белки" содержат один или несколько внеклеточных доменов рецептора в сочетании с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах реализации изобретения содержит шарнирную область, за которой следуют CH2- и CH3-домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-слитый белок содержит две или более отдельных цепей рецептора, которые связываются с одним или несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок является белком-ловушкой, таким как, например, белок-ловушка для IL-1 или белок-ловушка для VEGF.

Термин "не предусматривающий использование жидкостной хроматографии" означает, что в описанных способах и системах не используется методика жидкостной хроматографии.

II. Высокопроизводительный способ количественного определения антител с использованием масс-спектрометрии.

В данном документе описаны системы и способы количественного определения лекарственных препаратов белковой природы в образце, например, биологических средах отличного от человека животного. В одном варианте реализации изобретения лекарственный препарат белковой природы представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок. Как правило, антитело представляет собой моноклональное антитело. Точное и надежное количественное определение молекул лекарственного препарата белковой природы в образцах сыворотки/плазмы крови животного является крайне важным для обеспечения проведения токсикокинетических и фармакокинетических исследований в ходе разработки терапевтических средств на основе белков и антител. Другой вариант реализации изобретения относится к высокопроизводительным системам и способам, включающим не предусматривающий использование жидкостного хроматографа (без LC) способ с использованием масс-спектрометрии (MS) в режиме отслеживания параллельных реакций (parallel reaction monitoring, PRM) для количественного определения в образце mAb, как правило, антител человека (фиг. 1). Другой вариант реализации изобретения относится к способу, в котором используется прямой ввод с помощью наноспрея для высокопроизводительного анализа (<1 мин на образец, нулевая перекрестная контаминация) и универсальный суррогатный пептид (VSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO:1)) из Fc-области в качестве внутреннего контроля для количественного определения в образце общего mAb человека.

Иллюстративный способ, не предусматривающий использование жидкостной хроматографии, включает расщепление белка в образце на пептиды, добавление меченого тяжелым изотопом пептида в качестве стандарта, имеющего аминокислотную последовательность суррогатного пептида, такого как SEQ ID NO:1, фракционирование образца и анализ образца с использованием MS-системы с прямым вводом, содержащей одну или несколько ионных ловушек, два или более квадрупольных масс-анализаторов и источник ионизации электрораспылением (фиг. 2A).

Еще один вариант реализации изобретения относится к способу количественного определения концентрации антитела в образце, не предусматривающему использование жидкостной хроматографии, включающему этапы добавления в образец внутреннего стандарта, например, меченого антитела, расщепления антител в образце с образованием пептидов, разделения пептидов, например, с использованием твердофазной экстракции, и количественного определения антитела в образце, используя MS-систему с прямым вводом. В одном варианте реализации изобретения MS-система с прямым вводом включает одну или несколько ионных ловушек, два или более квадрупольных масс-анализаторов и источник ионизации электрораспылением (фиг. 2B).

Еще один вариант реализации изобретения относится к способу количественного определения целевых антител в образце, не предусматривающему использование жидкостной хроматографии, включающему этапы добавления в образец меченого антитела в качестве стандарта, расщепления антител в образце с образованием пептидов, фракционирования пептидов, и количественного определения целевых антител с использованием MS-системы с прямым вводом, содержащей одну или несколько ионных ловушек и два или более квадрупольных масс-анализаторов и источник ионизации электрораспылением (фиг. 2C).

Дополнительные сведения по способам и системам представлены в нижеследующих разделах.

A. Расщепление.

В одном варианте реализации изобретения представляющий интерес белок или лекарственный препарат белковой природы, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок, расщепляют с образованием пептидов, как правило, в 96-луночной планшете. В

одном варианте реализации изобретения меченый пептид в качестве внутреннего стандарта, например, SEQ ID NO:1, добавляют в образец, содержащий целевые антитела, а затем образец подвергают расщеплению белка. В другом варианте реализации изобретения в образец, содержащий целевые антитела, добавляют меченое антитело в качестве стандарта, а затем его подвергают расщеплению.

Способы расщепления белков известны в данной области техники. Белки можно расщеплять путем ферментативного расщепления с помощью протеолитических ферментов или путем неферментативного расщепления с помощью химических реагентов. Иллюстративные протеолитические ферменты для расщепления белков включают без ограничения трипсин, пепсин, химоотрипсин, термолизин, папаин, проназу, Arg-C, Asp-N, Glu-C, Lys-C и Lys-N. Для обеспечения полного расщепления можно использовать комбинации протеолитических ферментов. Иллюстративные химические реагенты для расщепления белков включают без ограничения муравьиную кислоту, соляную кислоту, уксусную кислоту, бромциан, 2-нитро-5-тиоцианобензоат и гидроксилламин.

В одном варианте реализации изобретения этап способа, заключающийся в расщеплении, осуществляют с использованием 96-луночных планшетов в автоматизированной рабочей станции Biomek® FX<sup>P</sup> от Beckman Coulter, которая обеспечивает скорость и производительность, крайне важные для современной или двумя головками, объединяющие в себе многоканальное распыливание (96 или 384) и распыливание Span-8, и она является идеальной для высокопроизводительных рабочих процессов.

В одном варианте реализации изобретения образец разводят 8 М мочевиной, трипсинизируют в течение ночи при соотношении 1 к 10 в восстанавливающих условиях. Иллюстративные восстанавливающие средства включают 2-меркаптоэтанол и дитиотреитол (DTT). В одном варианте реализации изобретения образец восстанавливают с помощью 10 мМ DTT.

#### В. Фракционирование.

После расщепления образец подвергают фракционированию с целью разделения образующихся в результате расщепления пептидов. В одном варианте реализации изобретения образец фракционируют в условиях, позволяющих сохранять пептид в качестве внутреннего стандарта (VVSVLTVLHQDWLNGK; (SEQ ID NO:1)) и удалять большинство других нежелательных компонентов для повышения чувствительности способа. В одном варианте реализации изобретения фракционирование осуществляют с использованием твердофазной экстракции, в частности, твердофазной экстракции с обращенной фазой в 96-луночном планшете.

#### 1. Твердофазная экстракция.

Параметры твердофазной экстракции (SPE) тестировали путем сравнения нескольких коммерчески доступных продуктов для SPE, включая планшет с 30 мг сорбента Oasis HLB с обращенной фазой, планшет с 10 мг сорбента Oasis HLB с обращенной фазой, планшет с 10 мг сорбента Strata-X с обращенной фазой, планшет с 2 мг сорбента Strata-X с обращенной фазой, планшет с обеспечивающим сильный катионный обмен сорбентом Strata-XC для смешанного режима разделения и планшет с обеспечивающим сильный анионный обмен сорбентом Strata-XC для смешанного режима разделения.

Параметры промывки и элюции исследовали на подвергнутых расщеплению образцах в коммерчески доступных планшетах с использованием 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24%, 26% ацетонитрила (ACN) (фиг. 8A). На фиг. 8B показан профиль ступенчатой элюции. На фиг. 8C показана интенсивность для пептида в качестве внутреннего контроля, определенная с помощью масс-спектрометрического анализа при указанных концентрациях промывки и элюирования ACN. Промывка 20% ACN с элюцией 24% ACN была определена как оптимальная.

Также осуществляли сравнение профилей элюции между 96-луночным планшетом с 10 мг сорбента Oasis HLB с обращенной фазой (фиг. 9A) и планшетом с 10 мг сорбента Strata-X с обращенной фазой (фиг. 9B). Данные показывают, что планшет с 2 мг сорбента Strata-X с обращенной фазой обеспечивал наиболее сильный сигнал 6,31E3 (фиг. 9B). В таблице показаны иллюстративные параметры SPE для фракционирования подвергнутых расщеплению образцов.

Иллюстративные условия SPE

Планшет для SPE	Планшет с 2 мг сорбента Strata-X с обращенной фазой
Условия кондиционирования	200 мкл 0,1% муравьиной кислоты в ACN
Условия уравнивания	200 мкл 0,1% муравьиной кислоты в воде
Загрузка образца	300 мкл смеси для расщепления при низком давлении (~5 фунтов/кв. дюйм)

Промывка 1	200 мкл 0,1% муравьиной кислоты в 10% ACN
Промывка 2	75 мкл 0,1% муравьиной кислоты в 20% ACN
Элюция 1	Добавить 30 мкл раствора для элюции (0,1% муравьиная кислота в 24% ACN) в центр каждой лунки, подождать 1 мин, затем приложить вакуум в течение 5 сек.
Элюция 2	Добавить 30 мкл раствора для элюции (0,1% муравьиная кислота в 24% ACN) в центр каждой лунки, подождать 1 мин, затем приложить вакуум в течение 60 сек.

### С. Масс-спектрометрический анализ.

В одном варианте реализации изобретения фракционированные пептиды подвергают количественному определению с использованием масс-спектрометрической системы, содержащей одну или несколько ионных ловушек и один или несколько гибридных квадрупольных масс-анализаторов, оснащенной источником ионизации электрораспылением. Иллюстративная масс-спектрометрическая система включает без ограничения масс-спектрометр Thermo Q Exactive™ Plus, работающий в режиме PRM и оснащенный системой TriVersa NanoMate® для инициирования ионизации наноэлектроспреем. Эта система обладает усовершенствованной квадрупольной технологией (AQT), которая обеспечивает улучшение отбора и пропуска предшественников для более точного количественного определения аналитов, присутствующих в сложных средах в низком количестве. Система также предусматривает высокотехнологичное независимое сканирование (DIA) и отслеживание параллельных реакций (PRM) для обеспечения воспроизводимого количественного определения с абсолютными качеством и достоверностью. Наконец, система обладает усовершенствованной направляющей активного ионного пучка (AABG), которая обеспечивает снижение шумов и увеличение интервалов между техническими обслуживаниями.

В одном варианте реализации изобретения данные количественного определения собирают с использованием последовательного сканирования в режиме PRM эндогенных и IST-пептидов. В некоторых вариантах реализации изобретения используют сканирование в режиме 2-плексного PRM. Данные для количественного определения ионов продукта собирают при разных MS<sup>2</sup>-сканированиях.

#### 1. Пептид в качестве внутреннего стандарта.

MS<sup>2</sup> калибруют с использованием меченого тяжелым изотопом пептида VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO:1) в качестве внутреннего стандарта. В некоторых вариантах реализации изобретения пептид в качестве внутреннего стандарта метят <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N и <sup>2</sup>H, например, изотопом можно метить один или несколько остатков Lys. SEQ ID NO:1 присутствует во всех изотипах IgG человека, и она может быть гарантированно получена в результате ферментативного расщепления. Указанная последовательность не может быть обнаружена у какого-либо другого вида животных, и она характеризуется надлежащей эффективностью ионизации при MS. В некоторых вариантах реализации изобретения пептид в качестве внутреннего стандарта добавляют в подлежащий анализу образец до расщепления белков в образце или одновременно с ним.

На фиг. 10А и 10В показаны калибровочные кривые с использованием SEQ ID NO:1. Энергия столкновений при HCD для MS<sup>2</sup>-анализа калибруется с использованием меченого тяжелым изотопом пептида в качестве внутреннего стандарта для достижения наилучшей интенсивности сигнала фрагментного иона, используемого для количественного анализа.

#### 2. Антитело в качестве внутреннего стандарта.

В некоторых вариантах реализации изобретения MS<sup>2</sup>-систему калибруют с использованием антитела, меченого тяжелым изотопом или масс-спектрометрической меткой. В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелый изотоп выбран из группы, состоящей из <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N и <sup>2</sup>H. Иллюстративное антитело в качестве внутреннего стандарта метят <sup>13</sup>C и <sup>15</sup>N по одному или нескольким остаткам Lys. В одном варианте реализации изобретения можно использовать универсальное меченое стабильным изотопом моноклональное антитело (человека) SiLu™ MAB в качестве стандарта.

На фиг. 11А и 11В показаны калибровочные кривые с использованием меченого антитела в качестве внутреннего стандарта. Фиг. 13А представляет собой сканограмму холостой пробы, а на фиг. 13В показана сканограмма с внутренним стандартом в холостой пробе. Как показано на фиг. 13А, одну серию образцов сыворотки крови обезьяны подвергали расщеплению трипсином с последующей очисткой с помощью автономной SPE. Затем ее анализировали с помощью MS, используя PRM-способ. Сигнал, соответствующий внутреннему стандарту, является очень низким (4,27E2). Как показано на фиг. 13В, в сыворотку крови обезьяны добавляли 10 мкг/мл внутреннего стандарта, а затем ее подвергали расщеплению трипсином с последующей очисткой с помощью автономной SPE. Затем ее анализировали с помощью MS, используя PRM-способ. Как можно увидеть, сигнал, соответствующий внутреннему стандарту,

составляет 1,97Е4. В этом эксперименте показано, что сыворотка крови обезьяны в качестве холостой пробы не предусматривает интерференции с внутренним стандартом.

### 3. Прецизионность и точность.

На фиг. 12 описаны данные, полученные из анализа контроля качества. NISTmAb, гуманизированное моноклональное IgG1k-антитело (Sigma-Aldrich), в 4 уровнях добавляли в сыворотку крови обезьяны в концентрации от 1 до 600 мкг/мл. Для каждого уровня независимо готовили 6 образцов. Все образцы подвергали расщеплению трипсином и очищали с помощью SPE. Все образцы анализировали с помощью MS. Используя калибровочную кривую, рассчитывали детектированную концентрацию. Точность рассчитывали с использованием средней детектированной концентрации, деленной на теоретическую концентрацию. Прецизионность рассчитывали с использованием % относительного стандартного отклонения (RSD) для 6 образцов на каждом уровне.

### 4. Анализ избирательности.

На фиг. 14 показаны результаты определения нижнего предела количественного обнаружения (LLOQ) с использованием разных серий образцов крови обезьяны. Этот эксперимент проводили с целью оценки матричного эффекта для данного способа. Были приобретены шесть различных серий сыворотки крови обезьяны, а затем в сыворотку крови обезьяны каждой серии по отдельности добавляли 1 мкг/мл и 2 мкг/мл mAb NIST. Также детектировали сигнал для сыворотки крови обезьяны каждой серии без mAb NIST (холостая проба). Затем рассчитывали соотношение сигнала, соответствующего 1 мкг/мл и 2 мкг/мл, и сигнала, соответствующего холостой пробе. В соответствии с требованием FDA в отношении квалификации метода, указанное соотношение должно составлять по меньшей мере 5. Также рассчитывали точность, с использованием детектированной концентрации, деленной на теоретическую концентрацию. В соответствии с требованием Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в отношении квалификации метода, значение точности для LLOD должно находиться в пределах 80-120%.

### 5. Оценка общей применимости.

На фиг. 15А показана калибровочная кривая, полученная в данном способе. В сыворотку крови обезьяны добавляли разные концентрации NISTmAb в диапазоне от 1 мкг/мл до 1000 мкг/мл, а затем в каждый образец добавляли 10 мкг/мл внутреннего стандарта с последующим расщеплением трипсином и очисткой с помощью SPE. Все образцы анализировали с помощью MS. Интенсивность для каждого образца нормализовали, используя IS, а затем наносили на график с теоретической концентрацией. На фиг. 15В показана увеличенная область для диапазона от 1 мкг/мл до 50 мкг/мл. Как показано, кривая хорошо совпадает со всеми точками в диапазоне низких концентраций. На фиг. 15С показаны такие же данные, как и на фиг. 12. Единственное отличие состоит в том, что в данном случае вместо NISTmAb использовали mAb1. mAb1 представляет собой IgG4, а NISTmAb представляет собой IgG1. Данные демонстрируют, что данный способ подходит как для IgG1, так и для IgG4.

Фиг. 16 представляет собой столбчатый график, на котором показано, что увеличение объема промывки улучшает LLOQ. По оси X представлен объем промывки, а по оси Y представлен ответ при концентрации 1 мкг/мл mAb/холостая проба. Данные демонстрируют, что увеличение объема промывки в ходе SPE может обеспечить улучшение LLOD. В сыворотку крови обезьяны добавляли 1 мкг/мл NISTmAb, и образец подвергали расщеплению трипсином. В ходе этапа SPE планшет промывали разными объемами промывочного буфера, при этом в остальной процедура оставалась одинаковой. В случае, когда объем промывки увеличивали с 100 мкл до 600 мкл, соотношение ответа в образце и такового для холостой пробы повышалось со значений, составляющих менее 4, до значений, составляющих более 6. В соответствии с требованием FDA в отношении квалификации метода, указанное соотношение для LLOD должно составлять по меньшей мере 5. Таким образом, путем увеличения объема промывки удалось улучшить LLOD до 1 мкг/мл.

### D. Представляющие интерес белки.

В одном варианте реализации изобретения представляющим интерес белком является лекарственный препарат белковой природы или представляющий интерес белок, подходящий для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Например, белок может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-слитый белок или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент. Белки в составе комплексов могут представлять собой простые полипептиды, состоящие из одной субъединицы, или сложные мультисубъединичные белки, содержащие две или более субъединиц. Представляющий интерес белок может представлять собой биологический препарат, пищевую добавку или консервант, или любой белковый продукт, подвергаемый очистке и определению стандартов качества.

В некоторых вариантах реализации изобретения представляющим интерес белком является антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, полиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, тетравалентная иммуноглобулин G-подобная молекула с двойной специфичностью, называемая иммуноглобулином с двойными вариабельными доменами

(DVD-Ig), IgD-антитело, IgE-антитело, IgM-антитело, IgG-антитело, IgG1-антитело, IgG2-антитело, IgG3-антитело или IgG4-антитело. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой IgG1-антитело. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой IgG2-антитело. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой IgG4-антитело. В другом варианте реализации изобретения антитело содержит химерный шарнир. В еще одних вариантах реализации изобретения антитело содержит химерный Fc. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой химерное IgG2/IgG4-антитело. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой химерное IgG2/IgG1-антитело. В одном варианте реализации изобретения антитело представляет собой химерное IgG2/IgG1/IgG4-антитело.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело выбрано из группы, состоящей из антитела к белку 1 запрограммированной гибели клеток (например, антитела к PD1, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела к лиганду 1 белка 1 запрограммированной гибели клеток (например, антитела к PD-L1, описанного в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), антитела к DLL4, антитела к ангиопоэтину-2 (например, антитела к ANG2, описанного в заявке на выдачу патента США № 9402898), антитела к ангиопоэтин-подобному белку 3 (например, антитела к AngPt3, описанного в заявке на выдачу патента США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, антитела к PDGFR, описанного в заявке на выдачу патента США № 9265827), антитела к Erb3, антитела к рецептору пролактина (например, антитела к PRLR, описанного в заявке на выдачу патента США № 9302015), антитела к компоненту комплемента 5 (например, антитела к C5, описанного в публикации заявки на патент США № US 2015/0313194 A1), антитела к TNF, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, антитела к EGFR, описанного в заявке на выдачу патента США № 9132192, или антитела к EGFRvIII, описанного в публикации заявки на патент США № US 2015/0259423 A1), антитела к пропротеиновой конвертазе субтилизин-кексинового типа 9 (например, антитела к PCSK9, описанного в заявке на выдачу патента США № 8062640 или заявке на выдачу патента США № 9540449), антитела к фактору роста и дифференцировки 8 (например, антитела к GDF8, также известного как антитело к миостатину, описанного в заявках на выдачу патента США №№ 8871209 или 9260515), антитела к рецептору глюкагона (например, антитела к GCGR, описанного в публикациях заявок на патент США №№ US 2015/0337045 A1 или US 2016/0075778 A1), антитела к VEGF, антитела к IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитела к IL4R, описанного в публикации заявки на патент США № US 2014/0271681 A1 или заявках на выдачу патента США №№ 8735095 или 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, антитела к IL6R, описанного в заявках на выдачу патента США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), антитела к IL1, антитела к IL2, антитела к IL3, антитела к IL4, антитела к IL5, антитела к IL6, антитела к IL7, антитела к интерлейкину 33 (например, антитела к IL33, описанного в заявках на выдачу патента США №№ 9453072 или 9637535), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, антитела к RSV, описанного в публикации заявки на патент США № 9447173), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, антитела к CD3, описанного в заявках на выдачу патента США №№ 9447173 и 9447173 и в заявке на выдачу патента США № 62/222605), антитела к кластеру дифференцировки 20 (например, антитела к CD20, описанного в заявках на выдачу патента США №№ 9657102 и US 20150266966 A1 и в заявке на выдачу патента США № 7879984), антитела к CD19, антитела к CD28, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, антитела к CD48, описанного в заявке на выдачу патента США № 9228014), антитела к Fel d1 (например, описанного в заявке на выдачу патента США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, антитела к MERS, описанного в публикации заявки на патент США № US 2015/0337029 A1), антитела к вирусу Эбола (например, описанного в публикации заявки на патент США № US 2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к белку, кодируемому геном 3 активации лимфоцитов (например, антитела к LAG3 или антитела к CD223), антитела к фактору роста нервов (например, антитела к NGF, описанного в публикации заявки на патент США № US 2016/0017029 и в заявках на выдачу патента США №№ 8309088 и 9353176) и антитела к белку Y. В некоторых вариантах реализации изобретения биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела к CD3 × CD20 (описанного в публикациях заявок на патент США №№ US 2014/0088295 A1 и US 20150266966 A1), биспецифического антитела к CD3 × муцину 16 (например, биспецифического антитела к CD3 × Muc16) и биспецифического антитела к CD3 × простатическому специфическому мембранному антигену (например, биспецифического антитела к CD3 × PSMA). В некоторых вариантах реализации изобретения представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-атто, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белимумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлотоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пэгола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтанзиналирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гуселькумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-абда, инфликсимаба-дайб, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксима-

ба, обинутузамаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В некоторых вариантах реализации изобретения представляющим интерес белком является рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или несколько внеклеточных доменов рецептора в сочетании с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следуют CH2- и CH3-домен IgG. В некоторых вариантах реализации изобретения рецепторный Fc-слитый белок содержит две или более отдельных цепей рецептора, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок-ловушку, такой как, например, белок-ловушка для IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. заявку на выдачу патента США № 6927004, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки), или белок-ловушка для VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, слитым с Fc hIgG1; см. заявку на выдачу патента США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах реализации изобретения Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или несколько из одного или нескольких антигенсвязывающих доменов, таких как варибельный фрагмент тяжелой цепи и варибельный фрагмент легкой цепи антитела, в сочетании с Fc-фрагментом.

### Примеры

#### Пример 1.

#### Материалы и способы:

Калибровочные стандарты (1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 и 1000 мкг/мл) и контроли качества (QC) (1, 3, 60 и 600 мкг/мл) готовили из стоковых растворов NISTmAb (10 мг/мл) путем серийных разведений сывороткой крови обезьяны в качестве контроля. Для анализа избирательности готовили два образца для лабораторного контроля качества (LQC) для шести разных серий сыворотки крови обезьяны в качестве холостой пробы путем добавления NISTmAb, гуманизированного моноклонального IgG1k-антитела, в концентрации 1 мкг/мл и 2 мкг/мл. В 20 мкл каждого стандартного образца, перед тем как подвергнуть его расщеплению трипсином, добавляли 200 нг меченного тяжелым изотопом mAb (IS-mAb). Каждый образец подвергали денатурации, восстановлению и расщеплению трипсином в течение ночи с последующей очисткой с использованием 96-луночного планшета для твердофазной экстракции (SPE). Условия промывки и элюции при SPE были оптимизированы с целью сохранения целевого пептида (VVSVLTVLHQDWLNGK; (SEQ ID NO:1)) и удаления большинства других нежелательных компонентов для повышения чувствительности способа. Для MS-анализа каждый образец вводили в масс-спектрометр Thermo Q Exactive Plus, работающий в режиме PRM и оснащенный системой TriVersa NanoMate для инициирования ионизации наноэлектроспреем. Данные собирали, используя способ мультиплексного PRM продолжительностью 45 секунд для каждого образца.

#### Результаты:

В исследовании универсального суррогатного пептида для количественного анализа был выбран пептид Fc VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO:1) по причине его хорошей MS-чувствительности, наличия в двух подклассах IgG человека (IgG1 и IgG4), широко используемых в терапевтических средствах на основе антител, а также по причине его отсутствия в IgG отличных от человека животных всех широко используемых видов. В ходе разработки способа все из условий расщепления трипсином, условий для SPE, параметров PRM и выбора фрагментного иона было оптимизировано. Условия для SPE были крайне важны для удаления большинства нежелательных компонентов, с сохранением при этом большей части суррогатного пептида. Параметры PRM и выбор фрагментного иона были ключевыми для надлежащей точности данных и чувствительности способа.

Используя как NISTmAb (подкласс IgG1), так и полученное в собственной лаборатории mAb4 (подкласс IgG4) в качестве тестируемых образцов, удалось достичь надлежащей линейной зависимости калибровочной кривой в диапазоне тестируемых концентраций 1-1000 мкг/мл. Избирательность данного способа оценивали с использованием шести разных серий сыворотки крови обезьяны, и было определено, что в разных сыворотках крови обезьяны нижний предел количественного обнаружения (LLOQ) составляет 1-2 мкг/мл. Кроме того, тестировали прецизионность и точность данного способа при четырех разных уровнях QC (1, 3, 60 и 600 мкг/мл), с точностью 95%-105% и CV <6%. Наконец, благодаря скорости анализа <1 мин на образец и нулевой перекрестной контаминации данный способ можно с уверенностью использовать в условиях высокопроизводительного анализа.

В результате оценки способа, для данного не предусматривающего LC способа с использованием PRM-MS было продемонстрировано, что он подходит для высокопроизводительного и общего количественного определения гуманизированных терапевтических mAb в сыворотке крови животного с диапазоном количественного определения 2-1000 мкг/мл.

Хотя в вышеприведенном описании данное изобретение было описано в привязке к определенным вариантам его реализации и множество деталей приведено с целью иллюстрации, специалистам в данной области техники будет понятно, что данное изобретение допускает дополнительные варианты реализации, и что некоторые из описанных в данном документе деталей могут существенно варьироваться без отклонения от основных принципов данного изобретения.

Все цитируемые в данном документе источники включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Данное изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отступления от его сущности или существенных признаков, и, соответственно, ссылаться следует не на вышеприведенное описание, а на прилагаемую формулу изобретения как определяющую объем изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ количественного определения целевых антител в образце, не предусматривающий использование жидкостной хроматографии, включающий:

добавление в образец антитела, меченного изотопом;  
расщепление антител в образце с образованием пептидов;  
фракционирование пептидов; и

количественное определение целевых антител, используя MS<sup>2</sup>-систему с прямым вводом, содержащую одну или несколько ионных ловушек и два или более квадрупольных масс-анализаторов и источник ионизации электрораспылением.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий этап добавления к пептидам меченого пептида Fc VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO:1) перед фракционированием.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что пептиды фракционируют с помощью твердофазной экстракции.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что твердофазная экстракция представляет собой твердофазную экстракцию с обращенной фазой.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что антитело, меченное изотопом, и меченный масс-спектрометрической меткой пептид Fc являются мечеными тяжелым изотопом.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что тяжелый изотоп выбран из группы, состоящей из <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N и <sup>2</sup>H.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что целевые антитела представляют собой моноклональное антитело человека.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что масс-спектрометрическая система представляет собой систему для тандемной масс-спектропии.

9. Способ количественного определения лекарственного препарата белковой природы в биологическом образце, не предусматривающий использование жидкостной хроматографии, включающий:

добавление в образец известного количества пептида, меченного масс-спектрометрической меткой, представляющей собой тяжелый изотоп, в качестве стандарта, имеющего аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:1;

расщепление лекарственного препарата белковой природы в образце на пептиды;

фракционирование пептидов в условиях, которые обеспечивают сохранение пептидов, имеющих аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:1;

анализ образца, содержащего пептиды лекарственного препарата белковой природы и пептиды в качестве стандартов, в отношении присутствия пептида, имеющего аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:1, используя MS<sup>2</sup>-систему, где указанный пептид, имеющий аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:1, используют в качестве стандарта для калибровки указанной MS<sup>2</sup>-системы, причем указанная MS<sup>2</sup>-система содержит одну или несколько ионных ловушек и два или более квадрупольных масс-анализаторов и источник ионизации электрораспылением; и

определение количества присутствующего в образце лекарственного препарата белковой природы исходя из наличия пептида, имеющего аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:1.

10. Способ по п.9, отличающийся тем, что данные для количественного определения ионов лекарственного препарата и ионов меченного масс-спектрометрической меткой пептида в качестве стандарта собирают при разных MS<sup>2</sup>-сканированиях.

11. Способ по п.9, отличающийся тем, что пептиды фракционируют, используя твердофазную экстракцию с обращенной фазой.

12. Способ по п.4 или 11, отличающийся тем, что при твердофазной экстракции с обращенной фазой используют 15-25% ацетонитрил в качестве промывки и элюцию 20-30% ацетонитрилом.

13. Способ по п.9, дополнительно включающий добавление в образец с лекарственным препаратом белковой природы меченного тяжелым изотопом лекарственного препарата белковой природы перед расщеплением образца.

14. Способ по п.1 или 9, отличающийся тем, что лекарственный препарат белковой природы содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, рекомбинантный белок, слитый белок или их

комбинацию.

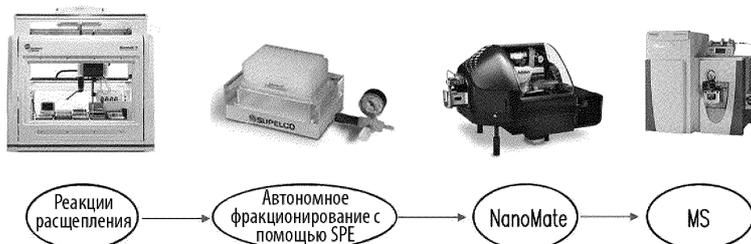
15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что образец содержит сыворотку крови.

16. Способ по любому из пп.1-15, который имеет динамический диапазон от 1 до 1000 мкг/мл.

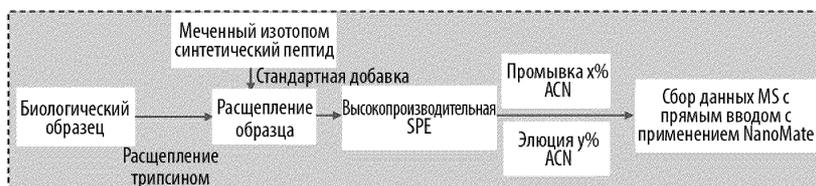
17. Способ по любому из пп.1-16, который имеет нижний предел количественного обнаружения (LLOQ) 1-2 мкг/мл.

18. Способ по любому из пп.1-17, который представляет собой автоматизированный высокопроизводительный способ.

19. Способ по п.18, который имеет скорость анализа менее 1 мин на образец.



Фиг. 1



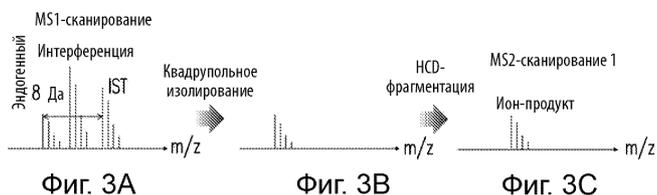
Фиг. 2А



Фиг. 2В



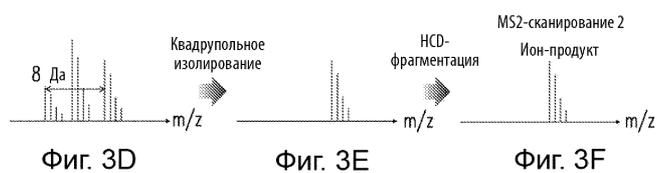
Фиг. 2С



Фиг. 3А

Фиг. 3В

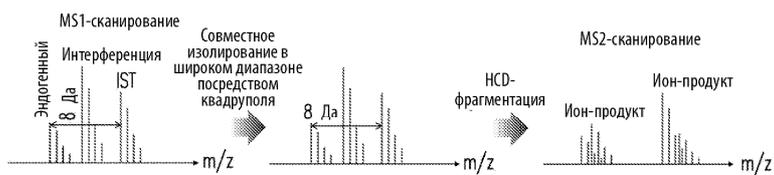
Фиг. 3С



Фиг. 3D

Фиг. 3Е

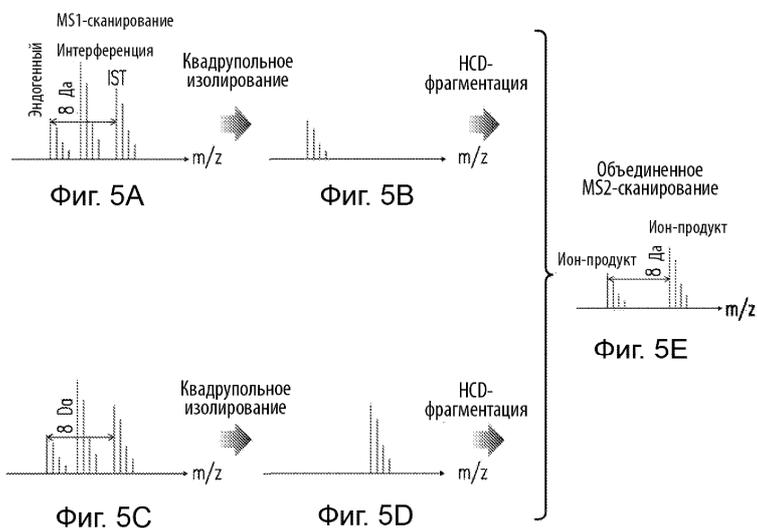
Фиг. 3F



Фиг. 4А

Фиг. 4В

Фиг. 4С



Фиг. 5А

Фиг. 5В

Фиг. 5Е

Фиг. 5С

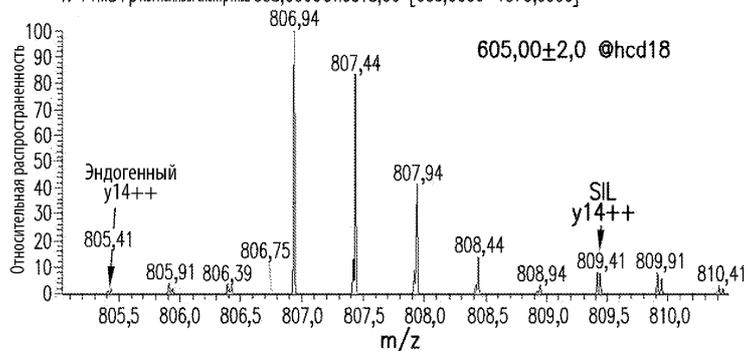
Фиг. 5D

**PRM с изолированием в широком диапазоне при концентрации 1 мкг/мл**

\_2mgStrataSPE\_20wash26elute\_1ugpm1\_2ngheavy\_highresolution\_CE18\_wideiso#3-20

RT: 0,26-1,73 AV: 18 NL: 1,28E5

T: FTMS+pNSI Полный спектр ms2 605,0000@hcd18,00 [600,0000-1875,0000]



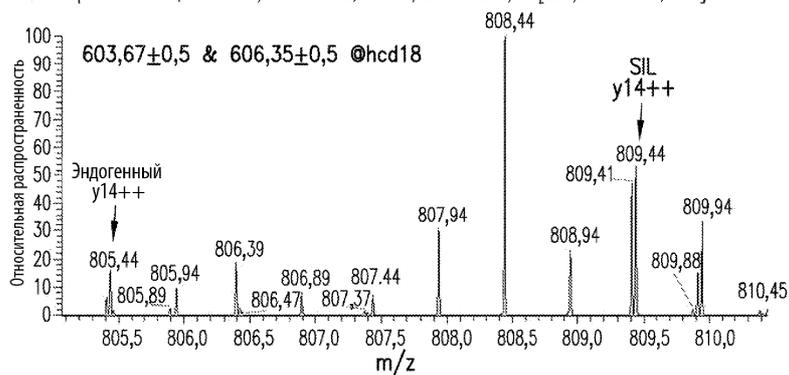
Фиг. 6А

**2-плексный PRM при концентрации 1 мкг/мл**

\_2mgStrataSPE\_20wash26elute\_1ugpm1\_2ngheavy\_highresolution\_CE18\_msx2 #2-10

RT: 0,20-0,96 AV: 9 NL: 2,42E4

T: FTMS+pNSI Полный спектр msx ms2 603,6700@hcd18,00 606,3500@hcd18,00 [600,0000-1875,0000]

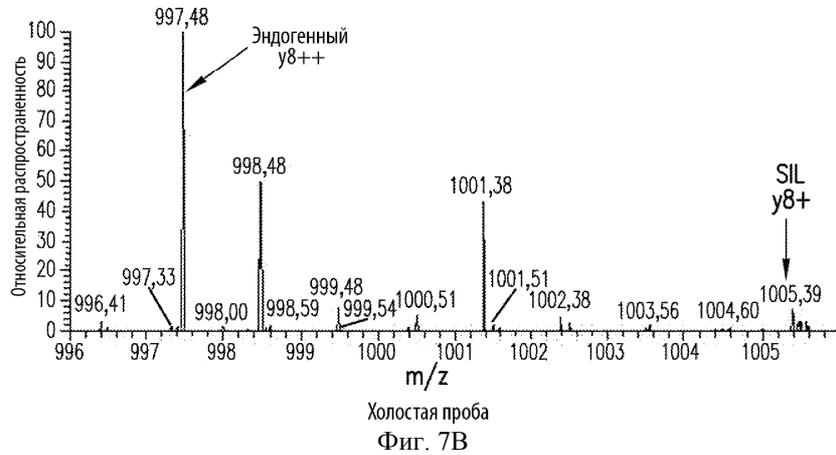


Фиг. 6В

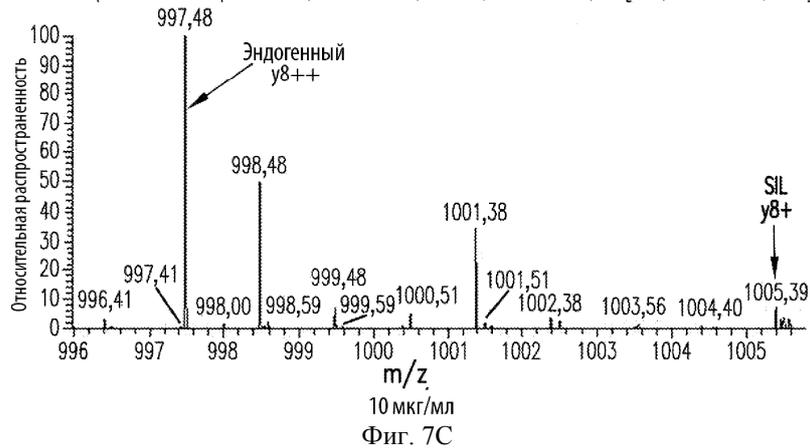
Ион-продукт	CE	Сигнал	Интерференция
y8 <sup>+</sup>	HCD 27	+++	+++
y9 <sup>+</sup>	HCD 27	+	+
y14 <sup>2+</sup>	HCD 27	+	+
y14 <sup>2+</sup>	HCD 18	+++	+

Фиг. 7А

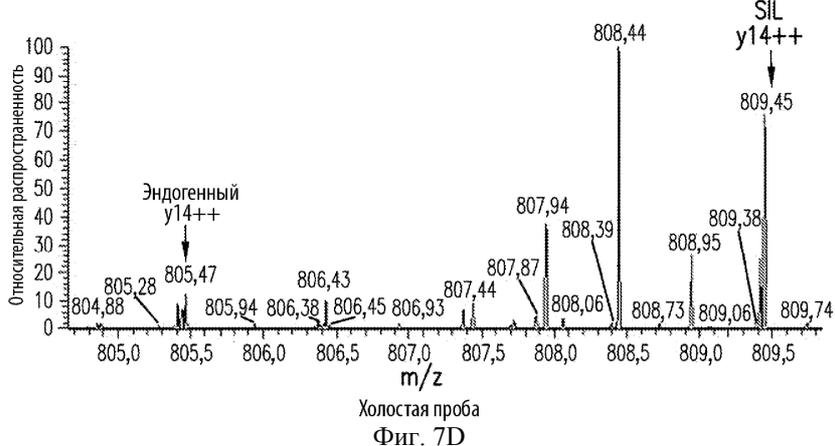
\_2mgStrataSPE\_20wash26elute\_0ugpml\_10ugmlHeavy\_140k\_mxs2\_CE27  
 #2-12 RT: 0,19-1,13 AV: 11 NL: 6,13E4  
 T: FTMS + p NSI Полный спектр mxs2 603,6700@hcd27,00 606,3500@hcd27,00 [600,0000-1875,0000]



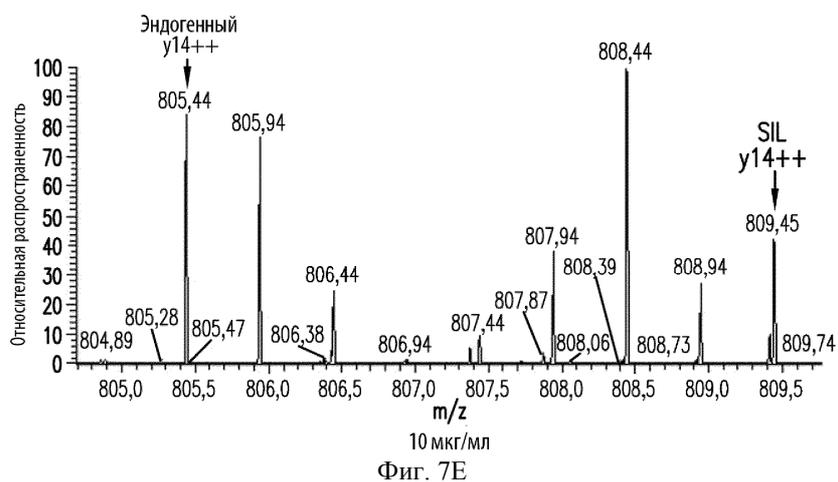
\_2mgStrataSPE\_20wash26elute\_10upmlHeavy\_140k\_mxs2\_CE27  
 #4-13 RT: 0,37-1,23 AV: 10 NL: 6,63E4  
 T: FTMS + p NSI Полный спектр mxs2 603,6700@hcd27,00 606,3500@hcd27,00 [600,0000-1875,0000]



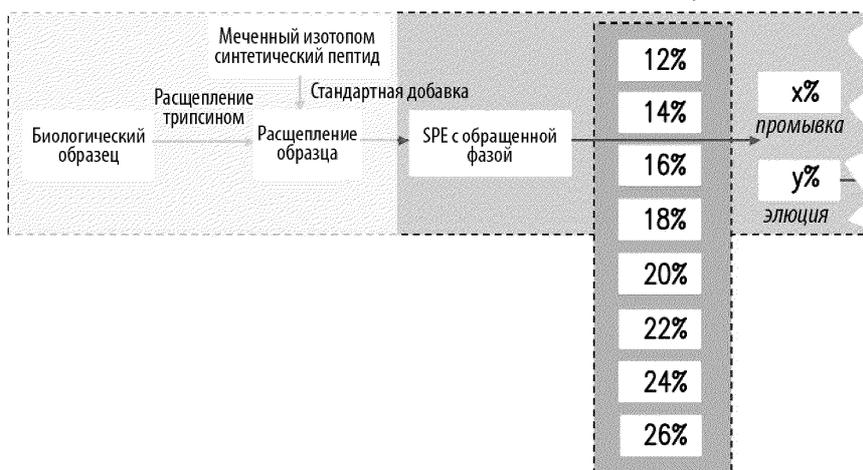
\_2mgStrataSPE\_20wash26elute\_0ugpm1\_10upmlHeavy\_140k\_msx2\_CE18  
 #4-15 RT: 0,37-1,43 AV: 12 NL: 5,11E4  
 T: FTMS + p NSI Полный спектр msxms2 603,6700@hcd18,00 606,3500@hcd18,00 [600,0000-1875,0000]



\_2mgStrataSPE\_20wash26elute\_10ugpm1\_10ugmlHeavy\_140k\_msx2\_CE18  
 #4-13 RT: 0,38-1,23 AV: 10 NL: 6,86E4  
 T: FTMS + p NSI Полный спектр msxms2 603,6700@hcd18,00 606,3500@hcd18,00 [600,0000-1875,0000]

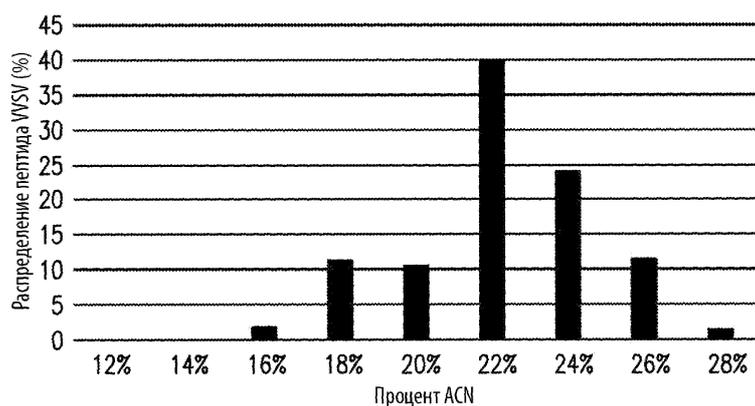


Пошаговая элюция в градиенте АСН



Фиг. 8А

Профиль пошаговой элюции

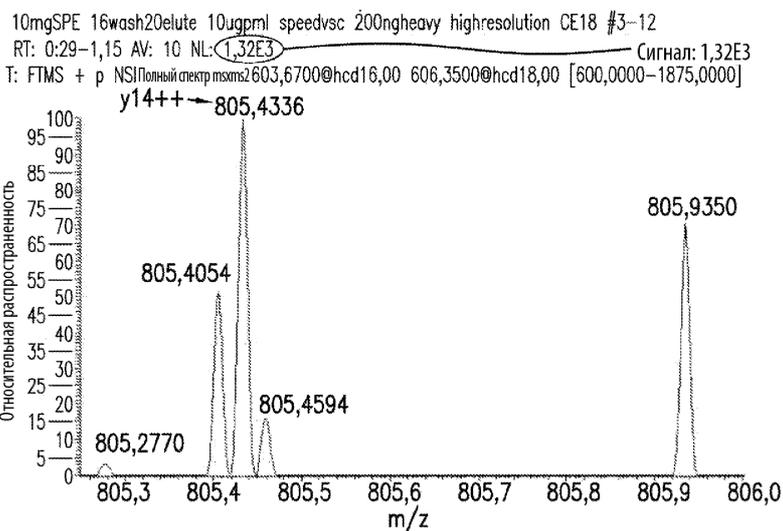


Фиг. 8В

Интенсивность для пептида VVSV, определенная с применением разных окон элюции с помощью ACN



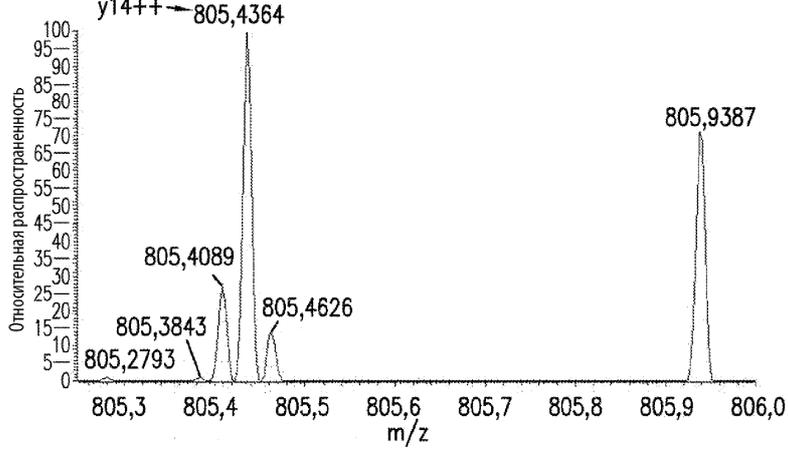
Фиг. 8С



Планшет с сорбентом Oasis для SPE (промывка 18% ACN, элюция 24% ACN)

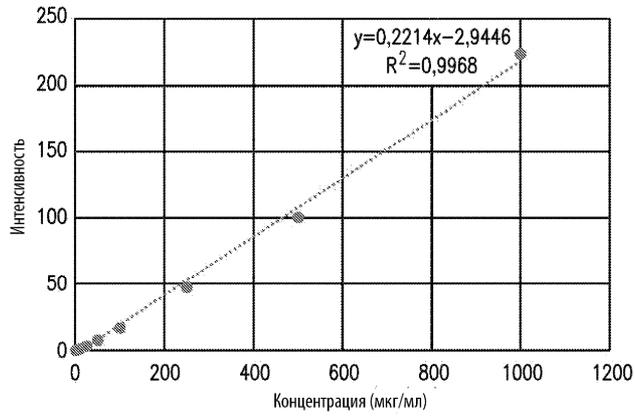
Фиг. 9А

2mgStrataSPE 20wash26elute 10ugpmi 20ngheavy highresolution CE18 #3-8  
 RT: 0:29-0,77 AV: 6 NL: (6,31E3) Сигнал: 6,31E3  
 T: FTMS + p NSIПолный спектр msxms2 603,6700@hcd18,00 606,3500@hcd18,00 [600,0000-1875,0000]

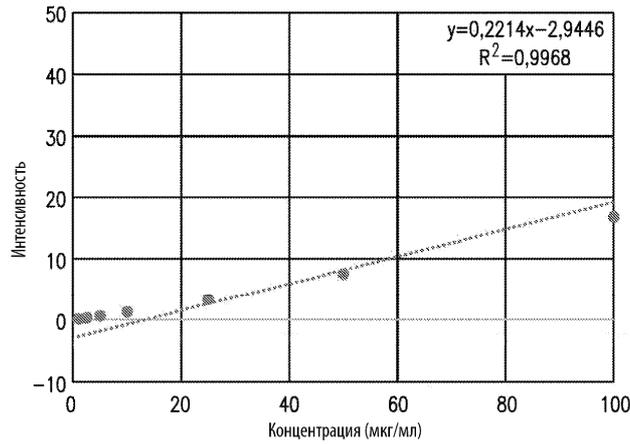


Планшет с сорбентом Strata-X для SPE (промывка 20% ACN, элюция 24% ACN)

Фиг. 9В

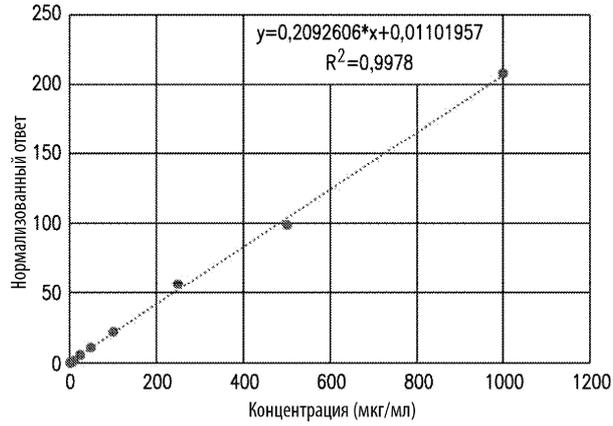


Фиг. 10А

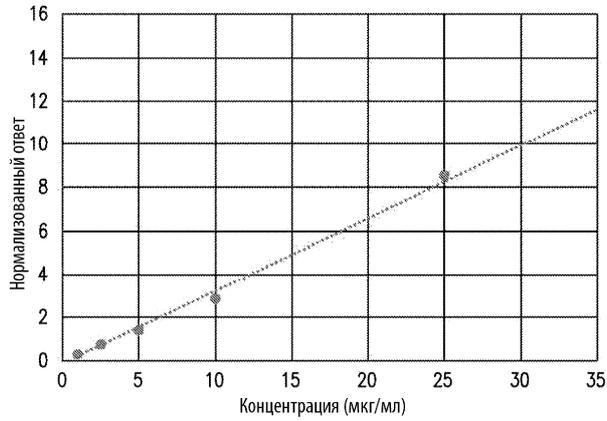


Фиг. 10В

046617



Фиг. 11А



Фиг. 11В

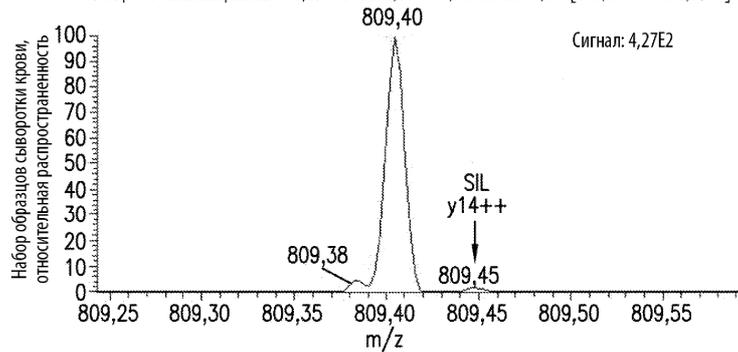
Воспроизводимость результатов (N=6)	Теоретическая конц. (мкг/мл)	Аналит: mAb NIST	
		Точность (%)	Прецизионность (%)
LLOQ	1	101,5	5,3
LQC	3	97,0	4,5
MQC	60	99,2	2,3
HQC	600	100,7	3,2

Фиг. 12

\_2mgStrataSPE\_20wash26elute\_0ugpmHeavy\_140k\_mxs2\_CE18 #4-16

RT: 0,37-1,47 Av: 13 NL: 2,60E4

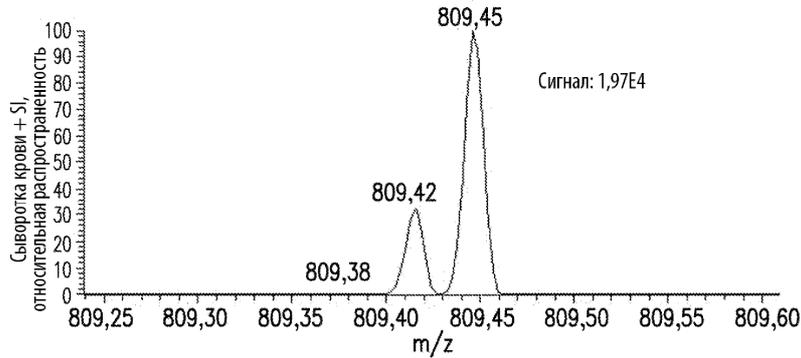
T: FTMS+p NS Полный спектр mxs.ms2 603,6700@hcd18,00 606,3500@hcd18,00 [600,0000-1875,0000]



Фиг. 13А

046617

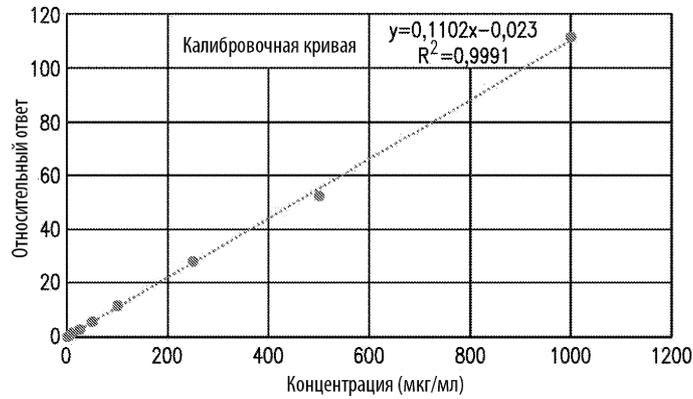
\_2mgStrataSPE\_20wash26elute\_0ugpmi\_10ugmiHeavy\_140k\_msx2\_CE18 #4-16  
 RT: 0,37-1,52 AV: 13 NL: 1,97E4  
 T:FIMS + p NSI Полный спектр msxms2 603,6700@hcd18,00 606,3500@hcd18,00 [600,0000-1875,0000]



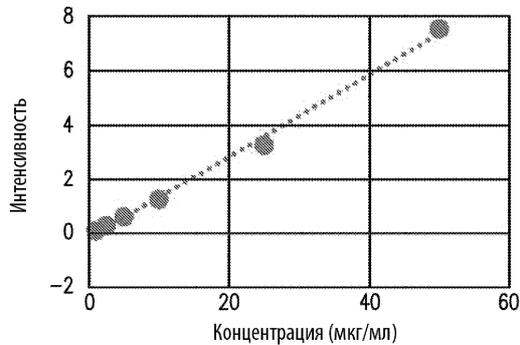
Фиг. 13В

	1 мкг/мл		2 мкг/мл	
	Ответ по сравнению с таковым для холостой пробы (соотношение)	Точность (%)	Ответ по сравнению с таковым для холостой пробы (соотношение)	Точность (%)
Серия 1	4,29	117,9	6,75	103,5
Серия 2	4,22	98,4	6,90	90,7
Серия 3	5,54	132,4	7,95	101,6
Серия 4	5,19	99,7	9,22	98,7
Серия 5	5,00	95,3	9,69	104,3
Серия 6	5,12	97,2	9,37	94,2

Фиг. 14



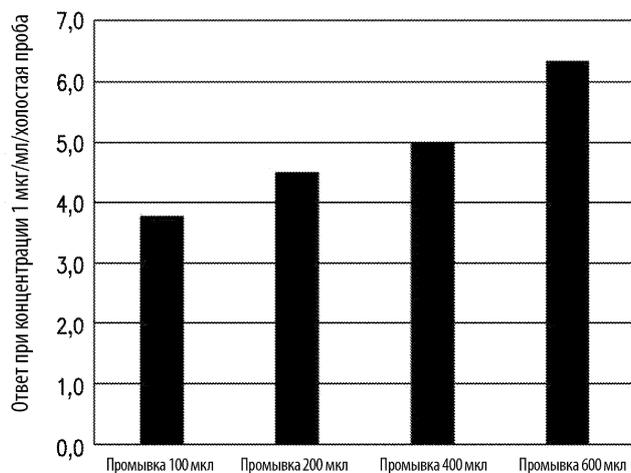
Фиг. 15А



Фиг. 15В

Воспроизводимость результатов (N=6)	Теоретическая конц. (мкг/мл)	mAb1	
		Точность (%)	Прецизионность (%)
LLOQ	1	110,2	9,7
LQC	3	96,0	6,4
MQC	60	98,3	2,1
HQC	600	101,6	1,3

Фиг. 15С



Фиг. 16

