

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046855**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.26

(21) Номер заявки
202192036

(22) Дата подачи заявки
2020.01.23

(51) Int. Cl. **B01D 15/34** (2006.01)
B01D 15/36 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

**(54) ОНЛАЙН-ХРОМАТОГРАФИЯ И МАСС-СПЕКТРОМЕТР С ИОНИЗАЦИЕЙ
ЭЛЕКТРОРАСПЫЛЕНИЕМ**

(31) 62/796,771

(32) 2019.01.25

(33) US

(43) 2021.10.18

(86) PCT/US2020/014721

(87) WO 2020/154465 2020.07.30

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

(72) Изобретатель:
Чжан Цян (US)

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

(56) SHEN M L ET AL.: "Effect of enzyme inhibitors on protein quaternary structure determined by on-line size exclusion chromatography-microelectrospray ionization mass spectrometry", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, ELSEVIER SCIENCE INC, US, vol. 12, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 97-104, XP004227094, ISSN: 1044-0305, DOI: 10.1016/51044-0305(00)00190-2 page 98, right-hand column, last paragraph page 99, right-hand column, last paragraph

MARKUS HABERGER ET AL.: "Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry", MABS, vol. 8, no. 2, 10 December 2015 (2015-12-10), pages 331-339, XP055687649, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2015.1122150 abstract page 333 Section: Discussion figure 3

ALEXANDRU C. LAZAR ET AL.: "Analysis of the composition of immunoconjugates using size-exclusion chromatography coupled to mass spectrometry", RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, vol. 19, no. 13, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 1806-1814, XP055183795, ISSN: 0951-4198, DOI: 10.1002/rcm.1987 page 1807, right-hand column - page 1808, left-hand column

B KUKRER ET AL.: "Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 27, no. 10, 3 August 2010 (2010-08-03), pages 2197-2204, XP019828053, ISSN: 1573-904X cited in the application abstract page 2198, right-hand column page 2199, right-hand column

WO-A1-2019152303

(57) В изобретении предлагаются способы и система для характеристики белков с использованием онлайн-хроматографии и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

B1

046855

046855 B1

Область техники

Данное изобретение в общем относится к способу характеристики биофармацевтических препаратов, содержащих белок, с использованием онлайн-хроматографии и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением.

Уровень техники

Биофармацевтические препараты, содержащие белок, стали важными лекарственными средствами для лечения онкологического заболевания, аутоиммунных заболеваний, инфекций и кардиометаболических нарушений, и представляют собой один из наиболее быстрорастущих сегментов фармацевтической промышленности.

Биофармацевтические препараты, содержащие белок, должны соответствовать очень высоким стандартам чистоты. Таким образом, может быть важным отслеживать и характеризовать биофармацевтические препараты, содержащие белок, на разных этапах разработки и производства лекарственного средства. Аналитический способ анализа характеристик таких биофармацевтических препаратов, содержащих белок, должен обеспечивать достаточную точность и разрешение для обнаружения и количественной оценки желаемого продукта. Оценка может быть затруднена из-за сходства между структурными и физико-химическими свойствами биофармацевтических препаратов, содержащих белок, по сравнению с его мутированной, модифицированной или расщепленной формой. Прямой анализ может потребовать выделения продукта в достаточно большом количестве для анализа, что является нежелательным и было возможным только в отдельных случаях.

В данной области техники давно существует потребность в способе и/или системе для характеристики биофармацевтических препаратов, содержащих белок.

Сущность изобретения

Рост разработки, производства и продажи биофармацевтических препаратов, содержащих белок, привел к увеличению спроса на определение характеристики биофармацевтического препарата, содержащего белок, наряду с возможными примесями, стехиометрией связывания и его общим составом.

Раскрытые в данном документе иллюстративные варианты реализации соответствуют вышеупомянутым требованиям, предлагая способы для характеристики, идентификации и/или количественного определения биофармацевтического препарата, содержащего белок, вместе с его возможными примесями, связыванием и общим составом.

В данном изобретении по меньшей мере частично предлагается способ для характеристики белка. В одном примерном варианте реализации, указанный способ характеристики белка включает приведение в контакт образца, содержащего белок, с хроматографической системой, содержащей хроматографическую смолу, промывку указанной смолы с использованием подвижной фазы для получения элюата, содержащего белок, и определение характеристики белка в указанном элюате с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать хроматографическую систему, содержащую смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать соединение масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей хроматографическую смолу.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать соединение масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащую смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру.

В одном аспекте указанный способ характеристики белка может включать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, работающий в нативных условиях.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением, работающий в нативных условиях.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать по меньшей мере один трехходовой разделитель потока для соединения масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать по меньшей мере один трехходовой разделитель потока для соединения ультрафиолетового детектора с хроматографической системой, содержащей смолу.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать по меньшей мере один трехходовой разделитель потока для соединения ультрафиолетового детектора и масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать по меньшей мере один трехходовой разделитель потока для соединения масс-спектрометра с

ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать по меньшей мере один трехходовой разделитель потока для соединения ультрафиолетового детектора с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать по меньшей мере один трехходовой разделитель потока для соединения ультрафиолетового детектора и масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать промывание смолы с применением подвижной фазы для получения элюата, содержащего белок, при этом элюат вводят в ультрафиолетовый детектор через по меньшей мере один трехходовой разделитель потока при скорости потока от около 0,2 до около 0,4 мл/мин.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать подвижную фазу, содержащую летучую соль.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать подвижную фазу, содержащую ацетат аммония.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать подвижную фазу с общей концентрацией менее около 100 мМ ацетата аммония.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать промывание смолы подвижной фазой со скоростью потока от около 0,2 до около 0,4 мл/мин.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать подвижную фазу с рН около 6,8.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать образец, содержащий белок в количестве от около 10 до около 100 мкг белка.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать белок, который представляет собой антитело.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать белок, который представляет собой комплекс антиген-антитело.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать белок, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением со скоростью потока от около 10 до около 50 нл/мин.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением с напряжением распыления в электрораспылении от около 0,8 до около 1,5 кВ.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для характеристики может включать идентификацию белка.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать количественное определение белка.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать количественное определение относительного содержания белка.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка может включать образец, содержащий по меньшей мере два белка.

В данном изобретении по меньшей мере частично предлагается способ для характеристики конъюгата антитело-лекарственное средство. В одном примерном варианте реализации, указанный способ для определения характеристик конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий приведение в контакт образца, в том числе конъюгата антитело-лекарственное средство, с хроматографической системой, содержащей хроматографическую смолу, промывку указанной смолы с использованием подвижной фазы для получения элюата, содержащего конъюгат антитело-лекарственное средство, и определения характеристик конъюгата антитело-лекарственное средство в указанном элюате с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата антитело-лекарственное средство может включать хроматографическую систему, содержащую смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата антитело-лекарственное средство может включать соединение масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей хроматографическую смолу.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата антитело-лекарственное средство может включать соединение масс-спектрометра с ионизацией электрорас-

напряжением распыления в электрораспылении от около 0,8 до около 1,5 кВ.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата анти-тело-лекарственное средство может включать конъюгат антитело-лекарственное средство, который представляет собой конъюгат сайт-специфическое антитело-лекарственное средство.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата анти-тело-лекарственное средство может включать конъюгат антитело-лекарственное средство, который не представляет собой конъюгат сайт-специфическое антитело-лекарственное средство.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата анти-тело-лекарственное средство может включать конъюгат антитело-лекарственное средство, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, сконструированный на основе цистеина.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата анти-тело-лекарственное средство может включать конъюгат антитело-лекарственное средство, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, сконструированный на основе неспецифического цистеина.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата анти-тело-лекарственное средство может включать определение соотношения лекарственного средства к антителу.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата анти-тело-лекарственное средство может включать идентификацию антитела.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики конъюгата анти-тело-лекарственное средство может включать количественное определение антитела.

В данном изобретении по меньшей мере частично предлагается система, содержащая хроматографическую колонку, содержащую хроматографическую смолу. В другом примерном варианте реализации, указанная система содержит хроматографическую колонку, содержащую хроматографическую смолу, причем хроматографическая колонка способна принимать подвижную фазу и образец, содержащий белок, и масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанная система может содержать хроматографическую колонку, содержащую смолу для эксклюзивной хроматографии.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанная система может содержать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, который может быть подключен к указанной хроматографической колонке.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанная система может содержать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, который может работать в нативных условиях.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанная система может содержать масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанная система может содержать хроматографическую колонку, которая может быть соединена с масс-спектрометром с использованием с использованием разделителя потока с тремя путями.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанная система может содержать хроматографическую колонку, которая может быть соединена с ультрафиолетовым детектором с использованием разделителя потока с тремя путями.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанная система может содержать хроматографическую колонку, которая может быть соединена с ультрафиолетовым детектором и масс-спектрометром с использованием разделителя потока с тремя путями.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанная система может быть способна характеризовать соотношение лекарственного средства к антителу в конъюгате антитело-лекарственное средство.

В одном аспекте данного варианта реализации, система может быть способна характеризовать белок.

В одном аспекте данного варианта реализации, система может быть способна характеризовать комплекс антиген-антитело.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 продемонстрированы спектры, полученные с помощью масс-спектрометрии с обычной и нативной ионизацией электрораспылением.

На фиг. 2 продемонстрирован примерный вариант реализации системы, способной охарактеризовать биофармацевтические препараты, содержащие белок.

На фиг. 3 продемонстрирован примерный вариант реализации системы, способной охарактеризовать биофармацевтические препараты, содержащие белок.

На фиг. 4 продемонстрирована установка для системы, способной охарактеризовать биофармацевтические препараты, содержащие белок согласно одному примерному варианту реализации.

На фиг. 5А и 5В продемонстрирован анализ комплекса антиген-антитело с системой, способной охарактеризовать биофармацевтические препараты, содержащие белок согласно одному примерному варианту реализации.

На фиг. 6 продемонстрированы результаты титрования антиген-антитело между Bet v 1 и Fab-1, охарактеризованные в соответствии с примерным вариантом реализации.

На фиг. 7A продемонстрирован сигнал масс-спектрометра в результате одновременного детектирования на двух длинах волн ультрафиолетовым детектором и взаимодействия антиген-антитело масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением в нативных условиях между Bet v 1 и Fab-1 в нативных условиях согласно примерному варианту реализации.

На фиг. 7B продемонстрирован ультрафиолетовый спектр в результате одновременного детектирования на двух длинах волн ультрафиолетовым детектором и взаимодействия антиген-антитело масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением в нативных условиях между Bet v 1 и Fab-1 в нативных условиях согласно примерному варианту реализации.

На фиг. 8A продемонстрирован необработанный спектр анализа определения соотношения лекарственного средства к антителам исходного mAb-1 для сайт-специфичного конъюгированного цистеина ADC-1 с помощью онлайн-инструментов SEC-нано-ИЭР-МС согласно примерному варианту реализации.

На фиг. 8B продемонстрирован необработанный спектр анализа соотношения лекарственного средства к антителу ADC-1 сайт-специфичного конъюгированного цистеина ADC-1 с помощью онлайн-инструментов SEC-нано-ИЭР-МС согласно примерному варианту реализации.

На фиг. 8C продемонстрирована свертка спектра анализа соотношения лекарственного средства к антителам исходного mAb-1 для сайт-специфичного конъюгированного цистеина ADC-1 с помощью онлайн-инструментов SEC-нано-ИЭР-МС согласно примерному варианту реализации.

На фиг. 8D продемонстрирована свертка спектра анализа соотношения лекарственного средства к антителу в ADC-1 сайт-специфичного конъюгированного цистеина ADC-1 с помощью онлайн-инструментов SEC-нано-ИЭР-МС согласно примерному варианту реализации.

На фиг. 9 продемонстрирован анализ соотношения лекарственного средства к антителу сайт-специфичного конъюгированного цистеина mAb-1 и ADC-1 с помощью расщепления FabRICATOR и онлайн-SEC-нано-ИЭР-МС в соответствии с примерным вариантом реализации.

На фиг. 10A продемонстрированы необработанные спектры анализа соотношения лекарственного средства к антителу исходного mAb-2 для сайт-специфичного конъюгированного цистеина ADC-2 с помощью онлайн-инструментов SEC-нано-ИЭР-МС в соответствии с примерным вариантом реализации, где N означает, что антитело не имеет гликан, S означает, что гликозилирование происходит с одной цепью антитела, а D означает, что гликозилирование происходит с обеими цепями антитела.

На фиг. 10B продемонстрирована свертка спектра анализа соотношения лекарственного средства к антителу исходного mAb-2 для сайт-специфичного конъюгированного цистеина ADC-2 с помощью онлайн-инструментов SEC-нано-ИЭР-МС в соответствии с примерным вариантом реализации, где N означает, что антитело не имеет гликан, S означает, что гликозилирование происходит с одной цепью антитела, а D означает, что гликозилирование происходит с обеими цепями антитела.

На фиг. 10C продемонстрированы необработанные спектры анализа соотношения лекарственного средства к антителу в ADC-2 сайт-специфичного конъюгированного цистеина ADC-2 с помощью онлайн-инструментов SEC-нано-ИЭР-МС в соответствии с примерным вариантом реализации, где N означает, что антитело не имеет гликан, S означает, что гликозилирование происходит с одной цепью антитела, а D означает, что гликозилирование происходит с обеими цепями антитела.

На фиг. 10D продемонстрирована свертка спектра анализа соотношения лекарственного средства к антителу в исходном ADC-2 сайт-специфичного конъюгированного цистеина ADC-2 с помощью онлайн-инструментов SEC-нано-ИЭР-МС в соответствии с примерным вариантом реализации, где N означает, что антитело не имеет гликан, S означает, что гликозилирование происходит с одной цепью антитела, а D означает, что гликозилирование происходит с обеими цепями антитела.

Подробное описание сущности изобретения

Идентификация и количественное определение белков в биофармацевтических препаратах, содержащих белок, могут быть очень важны во время производства и разработки препарата. Присутствие примесей и способ связывания биофармацевтического препарата могут иметь решающее значение для разработки безопасного и эффективного препарата. Следовательно, надежный способ и/или рабочий процесс для характеристики биофармацевтического препарата, содержащего белок, его способ связывания и характеристики любых сопутствующих примесей могут быть полезными.

Один из способов включает использование эксклюзионной хроматографии (SEC) для характеристики биомолекулярной агрегации и фрагментации в биотехнологической промышленности (Hong Paule et al., Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates, 35 JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY AND RELATED TECHNOLOGY 2923-2950 (2012)). Разделение молекул с помощью SEC основано на дифференциальном взаимодействии молекул с контролируемой пористой структурой на неподвижной фазе. Поскольку в SEC используются буферные условия, которые сохраняют нативную структуру белков в растворе, он позволяет характеризовать биомолекулы без нарушения их нативной конформации. Среди различных режимов обнаружения, которые могут быть связаны с SEC, масс-спектрометрия (МС) позволяет точно и достоверно идентифицировать отдельные компоненты в сложных образцах. Ранее сообщалось о комбинации SEC и МС, включая сбор пиков SEC с

последующей МС прямой инфузией (Başak Kükrer et al., Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography, 27 Pharmaceutical Research 2197-2204 (2010); Francois Debaene et al., Innovative Native MS Methodologies for Antibody Drug Conjugate Characterization: High Resolution Native MS and IM-MS for Average DAR and DAR Distribution Assessment, 86 Analytical Chemistry 10674-10683 (2014)) или онлайн-SEC-МС (Khaja Muneeruddin et al., Characterization of Small Protein Aggregates and Oligomers Using Size Exclusion Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry, 86 Analytical Chemistry 10692-10699 (2014); C. F. McDonagh et al., Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment, 19 PROTEIN ENGINEERING Design and Selection 299-307 (2006)). Однако для прямой ионизации высокого потока, создаваемого при разделении SEC, требуются жесткие условия ионизации, которые часто несовместимы с нативным МС анализом, тем самым ограничивая полезность объединения этих технологий для анализа нековалентных взаимодействий. Кроме того, чувствительность масс-спектрометра может пострадать из-за высоких концентраций соли, используемых в буферах SEC.

Поскольку нековалентные белковые взаимодействия опосредуют такой широкий спектр биологических функций, растет интерес к разработке методов, которые облегчают изучение их структуры, стехиометрии и динамики. Такие методы могут помочь исследовать нековалентные белковые взаимодействия, которые широко встречаются в природе, и координировать взаимодействие белковых биофармацевтических препаратов с разнообразными молекулами, включая другие белки и пептиды, нуклеиновые кислоты, липиды, а также требуются малые неорганические и органические молекулы. Эксклюзионная хроматография (SEC) позволяет изолировать биомолекулы из гетерогенных смесей молекулярных компонентов, и, поскольку буферные условия поддерживают белки в их нативной конформации, SEC является идеальным методом для сохранения нековалентных биомолекулярных комплексов во время их выделения. Среди различных методов обнаружения, которые могут быть объединены с анализом SEC, масс-спектрометрия (МС) позволяет уверенно идентифицировать и характеризовать отдельные компоненты сложных смесей. Однако нелетучие соли с высокой скоростью потока, используемые в SEC, часто несовместимы с последующим анализом МС.

Учитывая ограничения существующих методов, был разработан эффективный и действенный метод анализа биофармацевтических препаратов, содержащих белок, с использованием онлайн-хроматографии с платформой МС с ионизацией электрораспылением.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Изобретение включает любые эквивалентные методы и материалы, раскрытые в описании, которые могут быть использованы на практике или в режиме тестирования. Далее изобретение раскрыто на основе конкретных методов и материалов. Все публикации, процитированные в данном документе, включены в него полностью в качестве ссылки.

Формы единственного числа следует понимать, как означающие "по меньшей мере один"; и термины "около" и "приблизительно" следует понимать, как допускающие стандартные вариации, как будет понятно специалистам в данной области техники; а если указаны диапазоны, то включены конечные точки.

В некоторых примерных вариантах реализации, в данном изобретении предлагается способ для характеристики, идентификации и/или количественной оценки биофармацевтического препарата, содержащего белок.

Используемый в данном документе термин "биофармацевтический препарат, содержащий белок" включает действующее вещество, который полностью или частично является биологическим по природе. В некоторых примерных вариантах реализации, биофармацевтический препарат, содержащий белок, может содержать белок, вакцину, аллерген, нуклеиновые кислоты, вирус, конъюгат антитело-лекарственное средство, клетки, ген, ткани или их комбинации. В некоторых других примерных вариантах реализации, биофармацевтический препарат, содержащий белок, может содержать рекомбинантную, сконструированную, модифицированную, мутированную или усеченную версию белка, вакцину, аллерген, нуклеиновые кислоты, вирусы, конъюгаты антитело-лекарственное средство, клетки, гены, ткани или их комбинации.

Термин "белок", в контексте данного документа, включает любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или более полимерных цепей аминокислот, обычно известных в данной области как "полипептиды". "Полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и его синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов. "Синтетические пептиды или полипептиды" относятся к не встречающемуся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Известны различные методы твердофазного пептидного синтеза. Белок может содержать один или более полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, используе-

мых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других слитых белков химерного рецептора, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, антител человека и биспецифических антител. В другом иллюстративном аспекте белок может включать фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как бакуловирусная система в клетках насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Для обзора обсуждающих биотерапевтических белков и их производства, см. Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (BIOTECHNOL. GENET. ENG. REV. 147-175 (2012)). В некоторых иллюстративных вариантах реализации, белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Эти модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, белок FLAGtag, мальтозосвязывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), тус-эпитоп, флуоресцентные метки и другие красители и т.п. Белки могут быть классифицированы на основе состава и растворимости и, таким образом, могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и фиброзные белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белков, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации, белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, белок клетки-хозяина или их комбинации.

Термин "антитело", в контексте данного документа, включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (сокращенно HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно в данном документе LCVR или V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных иллюстративных вариантах реализации, FR антитела анти-big-ET-1 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Термин "антитело", в контексте данного документа, также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полноразмерного антитела. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генно-инженерный полипептид, или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полноразмерного антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для организации одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот, и так далее.

Термин "фрагмент антитела", в контексте данного документа, включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fc, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные 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 соединены пептидным линкером. Фрагмент антитела может быть получен различными способами. Например, фраг-

мент антитела может быть получен ферментативно или химически путем фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантно из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Альтернативно или дополнительно, фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать фрагмент одноцепочечного антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс.

Термин "моноклональное антитело", в контексте данного документа, не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридной технологии. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любыми способами, доступными или известными в данной области техники. Моноклональные антитела, применимые в соответствии с настоящим описанием, могут быть получены с использованием широкого разнообразия методов, известных в данной области техники, включая использование гибридных, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

Используемый в данном документе термин "конъюгат антитело-лекарственное средство" или "ADC" может относиться к антителу, присоединенному к биологически активному лекарственному средству(-ам) линкером (-ами) с лабильной связью (-ями). ADC может содержать несколько молекул биологически активного лекарственного средства (или полезной нагрузки), которые могут быть ковалентно связаны с боковыми цепями аминокислотных остатков антитела (Siler Panowski et al., Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy, 6 MABS 34-45 (2013)). Антитело, используемое для ADC, может быть способно связываться с достаточной аффинностью для селективного накопления и длительного удерживания на целевом сайте. Большинство ADC могут иметь значения K_d в наномолярном диапазоне. Полезная нагрузка может иметь эффективность в наномолярном/пикомолярном диапазоне и может достигать внутриклеточных концентраций, достигаемых после распределения ADC в ткани-мишени. Наконец, линкер, который образует связь между полезной нагрузкой и антителом, может быть достаточно стабильным в кровообращении, чтобы использовать фармакокинетические свойства фрагмента антитела (т.е. длительный период полужизни) и позволять полезной нагрузке оставаться прикрепленной к антителу по мере того, как оно распределяется в тканях, но должно обеспечивать эффективное высвобождение биологически активного лекарственного средства d после того, как ADC поглощается клетками-мишенями.

Линкеры могут быть теми, которые не расщепляются во время клеточного процессинга, и теми, которые расщепляются, когда ADC достигает целевого сайта. В случае нерасщепляемых линкеров биологически активное лекарственное средство, высвобождаемое в ходе вызова, включает полезную нагрузку и все элементы линкера, все еще присоединенные к аминокислотному остатку антитела, обычно остатку лизина или цистеина, после полной протеолитической деградации ADC в пределах лизосома. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, структура которых включает сайт расщепления между полезной нагрузкой и сайтом присоединения аминокислоты на антителе. Механизмы расщепления могут включать гидролиз кислотолабильных связей в кислых внутриклеточных компартментах, ферментативное расщепление амидных или сложноэфирных связей внутриклеточной протеазой или эстеразой и восстановительное расщепление дисульфидных связей восстанавливающей средой внутри клеток.

В некоторых конкретных примерных вариантах реализации, в данном изобретении также предлагается способ определения соотношения лекарственного средства к антителу (DAR) для конъюгата антитело-лекарственное средство.

ADC могут быть получены путем конъюгации с эндогенными аминокислотными остатками антитела, тщательно контролируя среднюю степень модификации, чтобы получить оптимальное соотношение лекарственное средство/антитело (DAR). Это соотношение может быть выбрано на основе (а) минимизации количества неконъюгированного антитела и (b) исключения видов в смеси с очень высоким DAR, что может быть проблематичным при производстве и приготовлении из-за более высокой гидрофобности и более низкой растворимости, и может привести к ухудшению фармакокинетических свойств. Присоединение слишком небольшого количества биологически активных молекул лекарственного средства приведет к снижению эффективности, тогда как слишком большое количество может сделать ADC нестабильным с измененными фармакокинетическими свойствами, повышенным клиренсом из плазмы, уменьшенным периодом полувыведения и повышенной системной токсичностью. Оптимальный DAR часто не определен и сильно зависит от других переменных ADC; однако чаще всего ADC стремятся достичь DAR, близкого к 4. Неограничивающий пример конъюгации биологически активного лекарственного средства с антителом может включать конъюгацию биологически активного лекарственного средства с остатками лизина или цистеина на антителе. Конъюгация лизина может приводить к образованию 0-8 конъюгированных молекул биологически активного лекарственного средства на одно антитело и может встречаться как на тяжелой, так и на легкой цепи при различных остатках лизина. Другой неограничивающий пример конъюгации биологически активного лекарственного средства с антителом может включать конъюгацию цистеина, которая происходит после восстановления четырех межцепочечных дисульфидных связей, и, таким образом, конъюгация ограничивается восемью открытыми сульфид-

рильными группами и, следовательно, связанные молекулы биологически активного лекарственного средства на антитело могут находиться в диапазоне от 0 до 8. Разнообразие гетерогенности смеси ADC двухкратное, поскольку эти виды ADC различаются по нагрузке лекарственным средством и сайту конъюгации. Следовательно, каждый вид может обладать различными свойствами, что может привести к широкому диапазону ФК-свойств *in vivo*. Кроме того, обеспечение однородности к серии к серии при производстве ADC может быть сложной задачей и может потребовать необходимых производственных мощностей.

Сайт-специфическая конъюгация антитело-лекарственное средство, при которой известное количество биологически активных молекул лекарственного средства постоянно конъюгировано с определенными сайтами, является одним из способов преодоления этих проблем. Гетерогенность сводится к минимуму, а свойства ADC более предсказуемы, с постоянным производством конъюгата от серии к серии. Соотношение лекарственное средство/антитело (DAR) точно контролируется и может быть адаптировано к различным связанным биологически активным лекарственным средствам, производящим либо 2-, либо 4-DAR сайт-специфичных ADC. Неограничивающие примеры сайт-специфической конъюгации включают связывание биологически активной молекулы лекарственного средства с антителом через сконструированный остаток цистеина, остаток глутамина, неприродные аминокислоты (например, п-ацетилфенилаланин, N6-((2-азидоэтокси)карбонил)-L-лизин, п-азидометил-L-фенилаланин, селеноцистеин), гликаны или короткие пептидные метки, как указано Qun Zhou в обзоре "Site-Specific Antibody Conjugation for ADC and Beyond" which is incorporated by reference (Qun Zhou, Site-Specific Antibody Conjugation for ADC and Beyond, 5 BIOMEDICINES 64 (2017)).

В некоторых примерных вариантах реализации, в данном изобретении предлагается способ для характеристики, идентификации и/или количественного определения по меньшей мере одной примеси в биофармацевтическом препарате, содержащим белок.

Термин "примесь", в контексте данного документа, может включать любой нежелательный белок, присутствующий в биофармацевтическом продукте, содержащем белок. Примеси могут включать технологические и родственные примеси. Кроме того, примесь может иметь известную структуру, частично охарактеризованную или неидентифицированную. Технологические примеси могут быть получены в процессе производства и могут включать три основные категории: полученные из клеточного субстрата, полученные из клеточной культуры и полученные в ходе выделения, и очистки продукта. Примеси, происходящие из клеточного субстрата, включают, но не ограничиваются ими, белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномная, векторная или общая ДНК клетки-хозяина). Примеси, полученные из клеточных культур, включают, но не ограничиваются ими, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, полученные ниже по потоку, включают, но не ограничиваются ими, ферменты, химические и биохимические обрабатывающие реагенты (например, цианогенбромид, гуанидин, окислители и восстановители), неорганические соли (например, тяжелые металлы, мышьяк, неметаллические ионы), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие удаляемые вымыванием вещества. Примеси, связанные с продуктом (например, предшественники, определенные продукты разложения), могут быть молекулярными вариантами, возникающими во время производства и/или хранения, которые не обладают свойствами, сравнимыми со свойствами желаемого продукта в отношении активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут потребовать значительных усилий по выделению и описанию, чтобы идентифицировать тип модификации (модификаций). Примеси, связанные с продуктом, могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются гидролитическими ферментами или химическими веществами, которые катализируют расщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают, но не ограничиваются ими, дезамидированные, изомеризованные, несоответствующие SS-связанные, окисленные или измененные конъюгированные формы (например, гликозилированием, фосфорилированием). Модифицированные формы могут также включать любую форму посттрансляционной модификации. Агрегаты включают димеры и образования более высокого порядка желаемого продукта. (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept. of Health and Humans Services).

Используемый в данном документе общий термин "посттрансляционные модификации" или "ПТМ" относится к ковалентным модификациям, которым подвергаются полипептиды либо во время (котрансляционная модификация), либо после (посттрансляционная модификация) их рибосомного синтеза. ПТМ обычно вводятся определенными ферментами или ферментными путями. Многие из них возникают на участке определенной характерной белковой последовательности (сигнатурной последовательности) внутри белкового остова. Было зарегистрировано несколько сотен РТМ, и эти модификации неизменно влияют на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. "Proteins" (2014) second edition, published by Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, расщепление, удлинение N-конца, деградацию белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование остатков лизина биотином), амидирование C-конца, гликозилирование, йодирование, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование (добавление ацетильной группы, обычно на N-конце белка), алкилирование (добавление алкильной группы

(например, метила, этила, пропила) обычно по лизину или аргинину остатков), метилирование, аденилирование, АДФ-рибозилирование, ковалентные поперечные связи внутри или между полипептидными цепями, сульфирование, пренилирование, зависимые от витамина С модификации (гидроксилирование пролина и лизина и амидирование карбоксильного конца), зависимую от витамина К модификацию, где витамин К представляет собой кофактор карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты, приводящий к образованию γ -карбоксиглутамата (остаток glu), глутамилирование (ковалентное связывание остатков глутаминовой кислоты), глицирование (ковалентная связывание остатков глицина), гликозилирование (добавление гликозильной группы к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, приводящее к гликопротеину), изопренилирование (добавление изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липоилирование (присоединение липоатной функциональности), фосфопантетеинилирование (добавление 4'-фосфопантетеинильного фрагмента из кофермента А, как в жирной кислоте, поликетиде, нерибосомном пептиде и биосинтезе лейцина), фосфорилирование (добавление фосфатной группы, обычно по серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфатирование (добавление сульфатной группы, обычно по остатку тирозина). Посттрансляционные модификации, которые изменяют химическую природу аминокислот, включают, но не ограничиваются ими, цитруллинирование (превращение аргинина в цитруллин путем деиминирования) и дезамидирование (превращение глутамина в глутаминовую кислоту или аспарагина в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, которые включают структурные изменения, включают, но не ограничиваются ими, образование дисульфидных мостиков (ковалентное связывание двух аминокислот цистеина) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). Некоторые посттрансляционные модификации включают добавление других белков или пептидов, таких как ISGyлирование (ковалентная связь с белком ISG15 (ген, стимулированный интерфероном)), SUMOилирование (ковалентная связь с белком SUMO (Малый убиквитин-подобный модификатор)) и убиквитинирование (ковалентная связь с белком убиквитином). См. European Bioinformatics Institute Protein Information Resource SIB Swiss Institute of Bioinformatics, European Bioinformatics Institute Drs-Drosomycin precursor-Drosophila melanogaster (Fruit fly)-Drs gene & protein, <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> (last visited Jan 15, 2019) для более подробного контролируемого словаря ПТМ, курируемого UniProt.

Используемый в данном документе термин "желаемый продукт" относится к биофармацевтическому препарату, содержащему белок, который имеет желаемую структуру, функцию или профиль эффективности.

В некоторых примерных вариантах реализации, в данном изобретении также предлагается способ для характеристики связывания биофармацевтического препарата, содержащего белок. Например, антитела могут связывать антигены посредством высокоспецифичных, высокоаффинных нековалентных взаимодействий, свойства, которое позволило разработать терапевтические антитела для нацеливания на специфические для болезни антигены при лечении различных заболеваний (Andrew C. Chan & Paul J. Carter, Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation, 10 NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY 301-316 (2010)). Для разработки эффективных терапевтических средств на основе антител может иметь решающее значение понимание того, как связывание антител влияет на функцию целевого белка.

В некоторых примерных вариантах реализации, в данном изобретении также предлагается способ определения соотношения связывания антитела к антигену из комплекса антиген-антитело.

В некоторых конкретных примерных вариантах реализации, изобретение также предлагает способ идентификации антигена, с которым связывается антитело. В некоторых других примерных вариантах реализации, способ может включать: определение того, являются ли расщепленные, модифицированные или мутированные версии антигена и/или антитела ответственными за комплекс антиген-антитело.

В некоторых примерных вариантах реализации, изобретение также предлагает способ количественного определения относительного содержания индивидуальных белков в растворе.

В некоторых примерных вариантах реализации, способ для характеристики, идентификации и/или количественной оценки биофармацевтического препарата, содержащего белок, его возможных примесей, связывания или композиции может включать приведение в контакт образца, биофармацевтического препарата, содержащего белок, с хроматографической системой, содержащей хроматографическую смолу.

Как используется в данном документе, термин "хроматография" относится к способу, в котором химическая смесь переносимая жидкостью или газом может быть разделена на компоненты в результате дифференциального распределения химических объектов, как они переносятся вокруг или над неподвижной жидкостью или твердой фазой. Неограничивающие примеры хроматографии включают традиционную обращенно-фазовую (ОФ), ионообменную (ИО), хроматографию в смешанном режиме и нормально-фазовую хроматографию (НФ).

Используемый в данном документе термин "хроматография в смешанном режиме (ХСР)" или "мультимодальная хроматография" включает хроматографический метод, в котором растворенные вещества взаимодействуют с неподвижной фазой посредством более чем одного режима или механизма взаимодействия. ХСР можно использовать в качестве альтернативы или дополнения к традиционной обращенно-фазовой (ОФ), ионообменной (ИО) и нормально-фазовой хроматографии (НФ). В отличие от ОФ,

НФ и ИО хроматографии, в которых гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие и ионное взаимодействие, соответственно, являются доминирующими режимами взаимодействия, хроматография в смешанном режиме может использовать комбинацию двух или более из этих режимов взаимодействия. Среда для хроматографии в смешанном режиме может обеспечить уникальную селективность, которую невозможно получить с помощью одномодальной хроматографии. Хроматография в смешанном режиме также может обеспечить потенциальную экономию затрат и гибкость работы по сравнению с методами, основанными на аффинности.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматография может быть гель-хроматографией.

Используемые в данном документе термины "смола для хроматографии SEC" или "среда для хроматографии SEC" используются взаимозаменяемо и могут включать твердую фазу любого типа, используемую в SEC, которая отделяет примесь от желаемого продукта (например, гомодимерная примесь для продукта биспецифических антител). Объем смолы, длина и диаметр используемой колонки, а также динамическая емкость и скорость потока могут зависеть от нескольких параметров, таких как объем обрабатываемой жидкости, концентрация белка в жидкости, которую необходимо обработать.

В некоторых примерных вариантах реализации, способ для характеристики, идентификации и/или количественной оценки биофармацевтического препарата, содержащего белок, его возможных примесей, связывания или композиции может включать приведение в контакт образца, биофармацевтического препарата, содержащего белок с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзивной хроматографии по размеру, промывку указанной смолы для эксклюзивной хроматографии по размеру с использованием подвижной фазы для получения элюата, содержащего белок; и определение характеристик белка в указанном элюате с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением.

Используемый в данном документе термин "масс-спектрометр" включает устройство, способное идентифицировать определенные молекулярные виды и точно измерять их массы. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в который можно элюировать полипептид или пептид для обнаружения и/или характеристики. Масс-спектрометр может включать три основные части: источник ионов, масс-анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры аналита могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы одновременно (как при ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов сильно зависит от области применения.

Используемый в данном документе термин "ионизация электрораспылением" или "ИЭР" относится к процессу ионизации распылением, в котором катионы или анионы в растворе переносятся в газовую фазу посредством образования и десольватации при атмосферном давлении потока сильно заряженных капель, который возникает в результате приложения разности потенциалов между кончиком иглы для электрораспыления, содержащей раствор, и противозлектродом. Обычно существует три основных стадии получения ионов в газовой фазе из ионов электролита в растворе. Это: (а) образование заряженных капель на кончике иглы для инфузии ЭР; (б) сжатие заряженных капель за счет испарения растворителя и повторяющегося распада капель, приводящего к маленьким сильно заряженным каплям, способным производить ионы в газовой фазе; и (с) механизм, с помощью которого ионы в газовой фазе образуются из очень маленьких и сильно заряженных капель. Стадии (а)-(с) обычно происходят в области устройства, где давление является атмосферным давлением.

Используемый в данном документе термин "установка для инфузии электрораспылением" относится к системе ионизации электрораспылением, которая совместима с масс-спектрометром, используемым для масс-анализа белка. При ионизации электрораспылением отверстие иглы электрораспыления расположено рядом с входным отверстием спектрометра. Образец, содержащий интересующий белок, можно прокачать через иглу шприца. Электрический потенциал между отверстием иглы шприца и отверстием, ведущим к масс-анализатору, образует аэрозоль ("электроспрей") раствора. Электрораспыление может осуществляться при атмосферном давлении и обеспечивает получение сильно заряженных капель раствора. Установка для инфузии с электрораспылением может включать эмиттер электроспрея, распыляющий газ и/или источник питания ИЭР. Установка может быть дополнительно автоматизирована для выполнения аспирации, распределения образца, доставки образца и/или для распыления образца.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может быть масс-спектрометром с ионизацией нанoeлектрораспылением.

Термин "нанoeлектрораспыление" или "нанораспыление" в контексте данного документа относится к ионизации электрораспылением при очень низкой скорости потока растворителя, обычно сотни нанолитров в минуту раствора образца или ниже, часто без использования внешней доставки растворителя. Установка для инфузии электроспрея, формирующая нанoeлектроспрей, может использовать статический эмиттер нанoeлектроспрея или динамический эмиттер нанoeлектроспрея. Статический эмиттер нанoeлектрораспыления выполняет непрерывный анализ небольших объемов раствора пробы (аналита) в течение длительного периода времени. Динамический эмиттер нанoeлектрораспыления использует капиллярную колонку и систему доставки растворителя для выполнения хроматографических разделений смесей перед анализом с помощью масс-спектрометра.

Используемый в данном документе термин "масс-анализатор" включает устройство, которое может

разделять частицы, то есть атомы, молекулы или кластеры, в соответствии с их массой. Неограничивающими примерами масс-анализаторов, которые можно использовать для быстрого секвенирования белков, являются времяпролетные (TOF), с магнитным/электрическим сектором, с квадрупольным масс-фильтром (Q), с квадрупольной ионной ловушкой (QIT), с орбитальной ловушкой, с ионно-циклотронным резонансом с преобразованием Фурье (FTICR), а также с методом ускорительной масс-спектрометрии (AMS).

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометрия может быть выполнена в нативных условиях.

Используемый в данном документе термин "нативные условия", "нативная МС" или "нативная ИЭР-МС" может включать проведение масс-спектрометрии в условиях, которые сохраняют нековалентные взаимодействия в анализе. Подробный обзор нативной МС см. в обзоре: Elisabetta Boeri Erba & Carlo Petosa, The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes, 24 PROTEIN SCIENCE 1176-1192 (2015). Некоторые различия между нативной ИЭР и обычной ИЭР показаны в таблице и на фиг. 1 (Hao Zhang et al., Native mass spectrometry of photosynthetic pigment-protein complexes, 587 FEBS Letters 1012-1020 (2013)).

	Нативная ИЭР	Обычная ИЭР
Образец раствора	Водный раствор вода, ацетат аммония	Частично органический раствор вода, муравьиная кислота, ацетонитрил/метанол (pH 1-2)
Состояние распыления	10-50 нл/мин Напряжение распыления 0,8-1,5 кВ Температура 20-30 °С	10-50 нл/мин Напряжение распыления 0,8-1,5 кВ Температура 20-30 °С
Обработка соли	Обессоливание офлайн	Обессоливание онлайн/офлайн с помощью ОФ-ВЭЖХ
Концентрация белка	1-10 мкМ (комплекс)	<1 мкМ (субъединица)
Выходная информация	Молекулярная масса белкового комплекса и субъединицы Нековалентные взаимодействия Стехиометрия Структура	Молекулярная масса одной субъединицы

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр может являть собой тандемный масс-спектрометр.

Используемый в данном документе термин "тандемная масс-спектрометрия" включает метод, в котором структурная информация о молекулах образца получается с использованием нескольких стадий массового отбора и разделения масс. Предварительным условием является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в неизменном виде, и что их можно заставить распадаться некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первой стадии массового отбора. Многоступенчатая МС/МС, или МСⁿ, может быть выполнена сначала путем отбора и выделения иона-предшественника (МС²), его фрагментирования, выделения иона первичного фрагмента (МС³), его фрагментирования, выделения вторичного фрагмента (МС⁴) и т.д. до тех пор, пока можно получить значимую информацию или детектировать ионный сигнал фрагмента. Тандемная МС успешно проводилась с широким спектром комбинаций анализаторов. Какие анализаторы комбинировать для определенного приложения, определяется множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размером, стоимостью и доступностью. Двумя основными категориями тандемных методов МС являются тандем-в-пространстве и тандем-во-времени, но есть также гибридные категории, когда тандем-во-времени анализаторы соединяются в пространстве или с тандем-в-пространстве анализаторами. Тандемный-в-пространстве масс-спектрометр включает источник ионов, устройство активации ионов-прекурсоров и, по меньшей мере, два масс-анализатора без улавливания. Конкретные функции разделения m/z могут быть спроектированы так, чтобы в одной секции прибора ионы выбирались, диссоциировали в промежуточной области, а ионы продукта затем передавались в другой анализатор для разделения m/z и сбора данных. В тандемном-во-времени масс-спектрометре ионы, произведенные в источнике ионов, могут быть захвачены, изолированы, фрагментированы и разделены по соотношению m/z в одном и том же физическом устройстве.

Пептиды, идентифицированные масс-спектрометром, можно использовать в качестве суррогатных

представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно использовать для характеристики белков путем сопоставления экспериментальных и теоретических данных МС/МС, последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Характеристика может включать, но не ограничивается, секвенирование аминокислот фрагментов белка, определение секвенирования белка, определение секвенирования белка de novo, определение местоположения посттрансляционных модификаций или идентификацию посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

Используемый в данном документе термин "база данных" относится к инструментам биоинформатики, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров МС-МС по всем возможным последовательностям в базе данных(ax). Неограничивающими примерами таких баз данных являются Mascot (<http://www.matrixscience.com>), Spectrum Mill (<http://www.chem.agilent.com>), PLGS (<http://www.waters.com>), PEAKS (<http://www.bioinformaticssolutions.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.http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>) или Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

Примерные варианты реализации.

Раскрытые в данном документе варианты реализации обеспечивают композиции, способы и системы для быстрой характеристики белков в образце.

Данное изобретение предлагает способ для идентификации белка, включающий приведение в контакт образца, в том числе белка, с хроматографической системой, содержащей хроматографическую смолу, промывку указанной хроматографической смолы с белком А с использованием подвижной фазы для получения элюата, включающего белок, и характеризацию белка в указанном элюате с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением.

Данное изобретение предлагает способ для идентификации конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий приведение в контакт образца, в том числе конъюгата антитело-лекарственное средство, с хроматографической системой, содержащей хроматографическую смолу, промывку указанной хроматографической смолы с белком А с использованием подвижной фазы для получения элюата, содержащего конъюгат антитело-лекарственное средство, и характеризацию конъюгата антитело-лекарственное средство в указанном элюате с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением.

Данное изобретение предлагает способ для идентификации комплекса антиген-антитело, включающий приведение в контакт образца, в том числе комплекса антиген-антитело, с хроматографической системой, содержащей хроматографическую смолу, промывку указанной хроматографической смолы с белком А с использованием подвижной фазы для получения элюата, содержащего комплекс антиген-антитело, и характеризацию комплекса антиген-антитело в указанном элюате с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая система может включать традиционную обращенно-фазовую (ОФ), ионообменную (ИО) или нормальной фазовую (НФ) хроматографии.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая смола может быть выбрана из смолы для аффинной хроматографии, анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, хроматографии в смешанном режиме, гидрофобной хроматографии или эксклюзионной хроматографии по размеру.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может быть масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может быть соединен с хроматографической системой с хроматографической смолой.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может работать в нативных условиях.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая система может быть соединена с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением с использованием трехходового разделителя потока.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая система может быть соединена с ультрафиолетовым детектором с использованием трехходового разделителя потока.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая система может быть соединена с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением и с ультрафиолетовым детектором с использованием трехходового разделителя потока.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая система может быть соединена с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением и с ультрафиолетовым детектором с использованием трехходового разделителя потока, при этом масс-спектрометр с ионизацией электрораспыления

ем представляет собой масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая система может быть соединена с масс-спектрометром и с ультрафиолетовым детектором с использованием трехходового разделителя потока, при этом масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением работающим в нативных условиях.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая система может быть соединена с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением и с ультрафиолетовым детектором с использованием трехходового разделителя потока, при этом масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением представляет собой масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением работающим в нативных условиях.

В некоторых примерных вариантах реализации, элюат, содержащий белок или комплекс антиген-антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство, после промывки смолы, вводится в ультрафиолетовый детектор через по меньшей мере один трехходовой разделитель потока при скорости потока от около 0,2 до около 0,4 мл/мин.

В некоторых примерных вариантах реализации, подвижная фаза для промывки имеет скорость потока от около 0,2 до около 0,4 мл/мин.

В некоторых примерных вариантах реализации, подвижная фаза может содержать летучую соль. В некоторых конкретных вариантах реализации, подвижная фаза может содержать ацетат аммония, бикарбонат аммония или формиат аммония или их комбинации.

В некоторых примерных вариантах реализации, используемая подвижная фаза может быть совместима с масс-спектрометром.

В некоторых примерных вариантах реализации, подвижная фаза может иметь pH около 6,0-8,0.

В некоторых примерных вариантах реализации, образец можно использовать в количестве от около 10 до около 100 мкг белка или комплекса антиген-антитело или конъюгата антитело-лекарственное средство.

В некоторых примерных вариантах реализации, скорость потока в масс-спектрометре с ионизацией электрораспылением может быть от около 10 до около 50 нл/мин.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может иметь напряжение распыления от около 0,8 до 1,5 кВ.

В некоторых примерных вариантах реализации, характеристика может включать идентификацию и/или количественную оценку белка. В одном аспекте характеристика может включать секвенирование белка, секвенирование белка de novo, идентификацию посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации. В другом аспекте характеристика может включать количественную оценку относительного содержания белка.

В некоторых примерных вариантах реализации, характеристика может включать идентификацию и/или количественную оценку антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство. В одном аспекте характеристика может включать секвенирование белка, секвенирование белка de novo, идентификацию посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации. В другом аспекте характеристика может включать количественную оценку относительного содержания антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство.

В некоторых примерных вариантах реализации, характеристика может включать идентификацию и/или количественную оценку антитела и/или антигена в комплексе антиген-антитело. В одном аспекте характеристика может включать секвенирование белка, секвенирование белка de novo, идентификацию посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации для антитела или антигена. В другом аспекте, характеристика может включать количественную оценку относительного содержания антитела и/или антигена в комплексе антиген-антитело.

В некоторых примерных вариантах реализации, образец может содержать по меньшей мере два белка.

В некоторых примерных вариантах реализации, конъюгат антитело-лекарственное средство может включать сайт-специфичный ADC или не-сайт-специфичный ADC. В одном аспекте конъюгат антитело-лекарственное средство может включать не-сайт-специфичные ADC, связанные через остатки цистеина или лизина антитела. В другом аспекте конъюгат антитело-лекарственное средство может включать сайт-специфичные ADC, связанные через природные аминокислоты, неприродные аминокислоты, гликаны, короткую пептидную тэг или их комбинации.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может быть тандемным масс-спектрометром.

В некоторых примерных вариантах реализации, белок может представлять собой терапевтическое антитело, антитело, моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, гибридный белок или их комбинации. В одном аспекте, указанный фрагмент может включать фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), триатела, тетратела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспе-

цифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

В некоторых примерных вариантах реализации, белок может быть продуктом расщепления антитела. Продукт расщепления может быть образован гидролизующим агентом. Продукт расщепления может быть примесью, связанной с продуктом.

В некоторых примерных вариантах реализации, белок может быть связанной с продуктом примесью, присутствующей в биофармацевтическом препарате.

В некоторых примерных вариантах реализации, этот белок может иметь pI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном аспекте, белок может быть белком с pI 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 одном примерном варианте реализации, образец может содержать по меньшей мере два белка.

Следует понимать, что способы не ограничены каким-либо из указанного выше белка, примеси, и колонки, и что способы идентификации или количественной оценки могут быть проведены с помощью любых подходящих средств.

В некоторых примерных вариантах реализации, это описание предлагает систему, содержащую хроматографическую колонку 100, содержащую хроматографическую смолу, содержащую белок А, причем хроматографическая колонка способна принимать подвижную фазу и образец, содержащий белок, и масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением 110 (см. Аиг. 2).

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая колонка 100 может содержать смолу, выбранную из смолы для хроматографии с гидрофобным взаимодействием, анионообменной хроматографии, анионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, эксклюзионной по размеру хроматографии, хроматографии со смешанным режимом или их комбинаций.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр 110 с ионизацией электрораспылением может быть соединен с указанной хроматографической колонкой 100.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр 110 с ионизацией электрораспылением может работать в нативных условиях.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр 110 с ионизацией электрораспылением может быть масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением.

В некоторых примерных вариантах реализации, масс-спектрометр 110 с ионизацией электрораспылением может быть масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением, работающим в нативных условиях.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая колонка 100 может быть подключена к масс-спектрометру 100 с ионизацией электрораспылением с использованием трехходового разделителя потока 120.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая колонка 100 может быть подключена к ультрафиолетовому детектору 130 с использованием трехходового разделителя потока 120.

В некоторых примерных вариантах реализации, хроматографическая колонка 100 может быть подключения к ультрафиолетовому детектору 130 и масс-спектрометру 110 с ионизацией электрораспылением с использованием трехходового разделителя потока 120.

В некоторых примерных вариантах реализации, трехходового разделитель потока 120 может быть способен непропорционально разделять поток, чтобы обеспечить поток от хроматографической колонки 100 к ультрафиолетовому детектору 130 и масс-спектрометру 110 с ионизацией электрораспылением.

В некоторых примерных вариантах реализации, система может быть способна характеризовать соотношение лекарственное средство-антитело в конъюгате антитело-лекарственное средство.

В некоторых примерных вариантах реализации, система может быть способна характеризовать белок.

В некоторых примерных вариантах реализации, система может быть способна характеризовать комплекс антиген-антитело.

Примерный вариант реализации системы, показан на фиг. 3. Трехходовый разделитель потока после колонки используется для двойного обнаружения УФ/МС. Фракция меньшего объема может быть направлена в МС, тогда как фракция большего объема направлена в УФ-детектор. Время удерживания почти одинаковое. Фракции после УФ-детектора могут быть собраны для извлечения образца.

Фиг. 4 установки отражает конкретный вариант реализации изобретения.

Понятно, что система не ограничена каким-либо из вышеуказанного белка, хроматографической колонки, масс-спектрометра, конъюгата антитело-лекарственное средство, комплекса антиген-антитело.

Последовательная маркировка стадий способа, как указано в данном документе, номерами и/или буквами не предназначена для ограничения способа или любых его вариантов конкретным указанным порядком.

Различные ссылки, включая патенты, патентные заявки, опубликованные патентные заявки, инвентарные номера, технические статьи и научные статьи цитируются по всему документу. Каждый источник

включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте и для любых целей.

Изобретение будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры, которые предоставлены для более подробного описания изобретения. Они предназначены для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения.

Примеры

Материалы и реагенты. Воду приобретали у компании Honeywell (Маскегон, Мичиган). Ацетат аммония приобретали у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури). 1 М Трис-НСl, рН 7,5 приобретали у Teknova (Холлистер, Калифорния). Трубки из плавленного кремнезема (внутренний диаметр (ID) 150 мкм, внешний диаметр (OD) 360 мкм), 3-ходовой соединитель и рукав приобретали у IDEX (Оак Хабор, Вашингтон). Кремнезёмовый наконечник PicoTip EMITTER (FS360-20-10-D-20-7CT) приобретали у New Objective (Воберн, Массачусетс). Колонку ACQUITY UPLC Protein BEH SEC, 200Å, 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм приобретали у Waters (Милфорд, Массачусетс). Нагреватель колонки с горячим карманом приобретали у Thermo-Fisher (Уолтем, Массачусетс). Все реагенты использовали без дополнительной очистки.

Онлайн-анализ SEC-нано-ИЭР-МС. Систему класса I ACQUITY ВЭЖХ (Waters, Милфорд, Массачусетс) подключали к гибриднему квадрупольному масс-спектрометру Q Exactive HF с орбитальной ловушкой (Thermo Scientific, Бремен, Германия) для всех онлайн-анализов SEC-нано-ИЭР-МС. Температуру колонки ACQUITY UPLC Protein BEH SEC (200Å, 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм) устанавливали на 30°C и использовали для разделения mAb и ADC. Подвижной фазой была 100 мМ ацетата аммония при рН 6,8. Каждое разделение длилось 30 мин со скоростью потока 0,3 мл/мин, и количество вводимого вещества составляло 40 мкг. Трехходовый разделитель потока (Т-разделитель) был подключен после колонки SEC. Трубку из плавленного кремнезема (Д: 140 см, ID: 150 мкм) и наконечник из кремнезема (SilicaTip) (Д: 5 см, ID: 10 мкм) подсоединяли к Т-разделителю. Фракцию большего объема подавали на УФ-детектор через трубку из плавленного кремнезема, тогда как фракцию меньшего объема подавали на МС через наконечник SilicaTip. Использовали следующие параметры МС для онлайн-сбора данных SEC-нано-ИЭР-МС. Каждый сбор данных длился 25 мин, начиная с момента ввода пробы. Образцы ионизировали в положительном режиме при напряжении распыления 3 кВ, температуре капилляров 200°C и уровне RF 70 S-линз. CID в источнике был установлен на 75 эВ. Полное МС-сканирование получали при разрешающей способности 15 К с диапазоном масс m/z 2000-8000. Максимальное время инъекции 100 мс, целевое значение автоматической регулировки усиления 3e6 и 10 микросканов использовались для полного сканирования МС.

Анализ данных. Для деконволюции исходных данных использовали программное обеспечение Protein Metrics Intact Mass. Браузер Thermo Xcalibur Qual использовали для анализа хроматограммы экстрагированных ионов. Microsoft Excel использовали для расчета DAR ADC.

Пример 1. Исследование взаимодействий антиген-антитело с помощью онлайн-SEC-нано-ИЭР-МС.

Для разработки эффективных терапевтических средств на основе антител может иметь решающее значение понимание того, как связывание антител влияет на функцию целевого белка.

1.1. Онлайн-измерительные приборы SEC-нано-ИЭР-МС.

Технологии SEC и МС обычно используются для характеристики образцов белка. SEC позволяет изолировать и охарактеризовать белки в условиях, которые минимизируют изменения в структуре белка, в то время как МС позволяет идентифицировать отдельные компоненты в сложных образцах. Объединение индивидуальных возможностей SEC и МС в единую платформу было бы очень желательно, но оказалось сложной задачей, поскольку высокая скорость потока и нелетучие соли, используемые для SEC анализов, несовместимы с нативной МС. Чтобы преодолеть это ограничение, было выполнено снижение поступления растворителя и соли в МС за счет разделения потока элюата из SEC с использованием постколоночного Т-разделителя (см. фиг. 3). Изображение установки представлено на фиг. 4. Затем Т-разделитель подключали к МС через SilicaTip и параллельно к УФ-детектору через трубку из плавленного кремнезема. Такая компоновка позволяла одновременно проводить двойное УФ/МС детектирование элюатов SEC. Путем изменения длины и диаметра трубки из плавленного кремнезема можно регулировать скорость потока к МС через SilicaTip (например, более длинные/узкие трубки могут создавать более высокое сопротивление, вызывая повышенный поток в SilicaTip и МС). Образцы белка разделяли с помощью колонки SEC 4,6 мм при скорости потока 0,3 мл/мин. Трубка из плавленного кремнезема, соединяющая Т-разделитель и УФ-детектор, длиной 140 см и внутренним диаметром 150 мкм обеспечила желаемую скорость потока ~ 1 мкл/мин на наконечник SilicaTip. Длина и диаметр трубки из плавленного кремнезема также позволяли почти синхронно обнаруживать молекулы в УФ и МС.

1.2. Комплекс антиген-антитело.

Комплекс, образованный между ранее описанным антителом (Qian Zhang et al., Epitope Mapping by HDX-MS Elucidates the Surface Coverage of Antigens Associated with High Blocking Efficiency of Antibodies to Birch Pollen Allergen, 90 ANALYTICAL CHEMISTRY 11315-11323 (2018)) и рекомбинантным Bet v 1 и антигеном Bet v 1 в нативных условиях МС.

Помимо голой формы, для Bet v 1 наблюдались две основные гликозилированные формы, включая G2S1F и G2S2F, как представлено на фиг. 5. После инкубации с равными молярными количествами ан-

титела Fab-1 все три формы Bet v 1 (голая, G2S1F и G2S2F) связывали Fab-1 в качестве одного антигена с одним комплексом Fab. на фиг. 5А, деконволютированный спектр нативной МС антигена Bet v 1 только выявил три различных вида Bet v 1: голый Bet v 1 и две основные гликозилированные формы, Bet v 1 G2S1F и G2S2F. Инкубация антигена Bet v 1 с равными молярными количествами антитела Bet v 1 Fab-1 продемонстрировала, что все три формы Bet v 1 (голый, G2S1F и G2S2F) образуют комплекс с Fab-1 в соотношении один антиген к одному Fab (фиг. 5В). Похоже, что гликозилирование не влияет на образование комплекса антитело/антиген, поскольку относительное количество сигнала МС для всех форм Bet v 1 было одинаковым в условиях несвязанного и связанного Fab-1.

Чтобы дополнительно охарактеризовать взаимодействие антиген-антитело, был проведен эксперимент по титрованию на платформе двойного обнаружения МС и УФ. Несколько различных соотношений Bet v 1 и Fab-1 исследовали с помощью УФ, как показано на фиг. 6. Только Bet v 1 (черный) элюируется через 8,5 мин, тогда как только Fab-1 (бирюзовый) и Bet v 1: Fab-1 комподекс элюируются через 9,8 мин и 7,9 мин, соответственно. Стехиометрия комплекса Bet v 1: Fab-1 выявила 1:1 коэффициент связывания. Никаких дополнительных стехиометрии не наблюдали для избыточных количеств антигена или антитела. Кроме того, смешивание антигена Bet v1 с Fab-1 в точном молярном соотношении 1:1 минимизировало количество свободного антигена и антитела (синий).

В то время как УФ-пики могут отражать относительное содержание отдельных белков в растворе, МС позволяет идентифицировать отдельные компоненты в сложных образцах. С двойным детектированием УФ и МС, можно определить все виды, совместно элюирующиеся в пределах одного УФ-пика или в разных УФ-пиках. Как показано на фиг. 7, МС анализ УФ пика, который элюируется через 7,9 мин, показывает три различных комплекса, образованных Fab-1, связанным с каждым из трех различных видов Bet v 1 (голый, G2S1F и G2S2F). Мы обнаружили, что Fab-1: голый комплекс элюируется после Fab-1 в комплексе с гликозилированными частицами Bet v 1, что может быть связано с большим гидродинамическим радиусом, обеспечиваемым гликанами. Сведение к минимуму задержки обнаружения между УФ и МС позволило собрать фракции после УФ детектора для восстановления образца. Этот способ особенно полезен для определения того, сохраняют ли связывание расщепленные, модифицированные или мутированные версии антигена и/или антитела без необходимости очистки конкретных форм исследуемых белков.

Пример 2. Характеристика цистеиновых ADC с помощью онлайн-SEC-нано-ИЭР-МС.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) являются очень эффективными терапевтическими средствами, которые могут специфически доставить малые молекулы лекарственного средства к ткани-мишени путем их конъюгирования с антителами (Francois Debaene et al., Innovative Native MS Methodologies for Antibody Drug Conjugate Characterization: High Resolution Native MS and IM-MS for Average DAR and DAR Distribution Assessment, 86 ANALYTICAL CHEMISTRY 10674-10683 (2014)). Активность, эффективность и токсичность ADC могут сильно зависеть от количества малых молекул лекарственного средства, конъюгированных с каждым антителом. Следовательно, может быть критичным определить соотношение лекарственного средство-антитело (DAR) для каждого ADC. Конъюгирование через межцепочечные цистеины является одним из наиболее распространенных подходов при конъюгировании малых молекул лекарственных средств с антителами. Для межцепочечных ADC на основе цистеина неспаренные межцепочечные остатки цистеина могут быть введены путем конструирования мутаций первичной последовательности (сайт-специфичные межцепочечные конъюгаты на основе цистеина) или посредством частичного восстановления антитела (случайные межцепочечные конъюгаты на основе цистеина). Сайт-специфическое конъюгирование сконструированных mAb обеспечивает лучший контроль над DAR ADC, тогда как конъюгирование, выполняемое на частично восстановленных mAb, дает более изменчивый диапазон DAR (от нуля до восьми). Тем не менее, по-прежнему может быть необходимо определить DAR ADC, генерируемых любым из способов, для понимания и интерпретации биологических эффектов этих конъюгатов лекарственных средств. Наиболее распространенный способ для определения DAR ADC на основе цистеина является способ с помощью HIC-УФ (Laura R. Saunders et al., A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo, 7 SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE (2015) или ОФЖХ-МС в восстановительных/денатурирующих условиях. Однако недавно Debaene et al. сообщили об автономном способе обесоливания SEC в сочетании с нативными МС и LM-МС высокого разрешения для измерения среднего DAR. Нативный МС-анализ является единственным способом проанализировать DAR для конъюгированных с цистеином ADC без разрушения интактной молекулы.

1.1. Онлайн-измерительные приборы SEC-нано-ИЭР-МС.

Использовали приборы, представленные в 1.1.

1.2. Сайт-специфичный конъюгированный ADC на основе цистеина.

Оценивали DAR сайт-специфичных конъюгированных ADC на основе цистеина с использованием онлайн-системы SEC-нано-ИЭР-МС. Мутации межцепочечных цистеинов на тяжелых цепях mAb вводили два неспаренных цистеина на легких цепях mAb, которые были конъюгированы с лекарственным средством с образованием антител с DAR 2. Как показано на фиг. 8, необработанные и деконволютированные спектры родительского mAb-1 и ADC-1 показывают, что в образце ADC присутствует только

форма с DAR 2. Деконволютированные спектры на фиг. 8А-С показывают, что различные гликаны присутствуют как на исходном mAb-1, так и на конъюгированном ADC-1. Наряду с негликозилированным mAb-1, частично и полностью гликозилированные виды mAb-1, имеющие различные комбинации G0F, G1F и G2F, все были конъюгированы с 2 лекарственными средствами. Эти результаты были подтверждены анализом mAb-1 и ADC-1, расщепленных производителем, как показано на фиг. 9. Несколько ADC с аналогичной химией конъюгирования были протестированы и показали только форму с DAR 2 (данные не показаны).

1.3. Неспецифический цистеин-конъюгированный ADC.

Помимо анализа сайт-специфичных ADC, также исследовали DAR лекарственного средства, конъюгированного с межцепочечными цистеинами частично восстановленных mAb. Необработанные и деконволютированные спектры неспецифического конъюгированного с цистеином ADC, полученные с использованием аналогичной химии, показаны на фиг. 10. ADC-2 генерировали с немодифицированным исходным антителом с нормальным гликозилированием. Необработанные и деконволютированные спектры исходного mAb-2 (фиг. 10А, В) и ADC-2 (фиг. 10С-Д) показывают значения DAR, которые варьируются от 2-8 для ADC-2. Спектры после деконволюции также показывают различные гликаны, присутствующие в mAb-2 (фиг. 10В) и ADC-2 (фиг. 10Д).

Была разработана онлайн-платформа для ионизации SEC-нано-электрораспылением (нано-ИЭР)-МС с двойным ультрафиолетовым (УФ) и МС-детектированием. Полезность этой платформы была подтверждена путем изучения нековалентных белковых взаимодействий с использованием ее для характеристики комплексов антиген-антитело, полученных в результате экспериментов по титрованию, и определения отношения лекарственное средство-антитело (DAR) конъюгатов антитело-лекарственное средство на основе цистеина (ADC). Эта платформа может быть легко модифицирована и, следовательно, может быть адаптирована для анализа других нативных проектов МС, таких как характеристика вариантов заряда моноклональных антител (mAb) или больших агрегированных белковых комплексов.

Трехходовый разделитель потока использовали для непропорционального разделения элюатов SEC на МС и УФ-детектор, при этом фракция меньшего объема направляется на МС, а фракция большего объема на УФ-детектор. Текущая платформа обеспечивает возможность комплементарного двойного обнаружения с помощью УФ и нативной МС с возможностью сбора фракций и может применяться для характеристики комплексов антиген-антитело и DAR анализа ADC, конъюгированных с межцепочечным цистеином. Дальнейшие модификации этой онлайн-платформы SEC-нано-ИЭР-МС, такие как изменение химического состава колонки или использование прибора Q Exactive UHMR, позволят адаптировать ее для других приложений, таких как анализ вариантов заряда или очень больших белковых комплексов. Описанный в данном документе способ открыл возможность комбинирования методов разделения с высоким содержанием солей (например, HIC, WCX) с обнаружением на основе масс-спектрометрии. В заключение онлайн платформа SEC-нано-ИЭР-МС может быть широко применена для анализа биофармацевтических препаратов, содержащих белок, для различных применений.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ характеристики конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий: приведение образца, содержащего конъюгат антитело-лекарственное средство, в контакт с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру; промывание указанной смолы для эксклюзионной хроматографии по размеру с применением подвижной фазы для получения элюата, содержащего конъюгат антитело-лекарственное средство; и характеристику конъюгата антитело-лекарственное средство в указанном элюате с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением в нативных условиях, при этом для соединения масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру, используется по меньшей мере один трехходовый разделитель потока.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением соединен с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру, или масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением соединен онлайн с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением является масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что по меньшей мере один трехходовый разделитель потока применяется для соединения ультрафиолетового детектора с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии по размеру.
5. Способ по п.4, отличающийся тем, что элюат после промывки смолы для эксклюзионной хроматографии по размеру вводят в ультрафиолетовый детектор через по меньшей мере один трехходовой разделитель потока со скоростью потока от 0,2 до 0,4 мл/мин.
6. Способ по п.1, отличающийся тем, что подвижная фаза, применяемая для промывки смолы для

экслюзионной хроматографии по размеру, содержит ацетат аммония.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что подвижная фаза, применяемая для промывки смолы для экслюзионной хроматографии по размеру, содержит летучую соль.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что подвижная фаза, применяемая для промывки смолы для экслюзионной хроматографии по размеру, имеет общую концентрацию около 100 мМ.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что подвижная фаза, применяемая для промывки смолы для экслюзионной хроматографии по размеру, имеет скорость потока от 0,2 до 0,4 мл/мин.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что подвижная фаза, применяемая для промывки смолы для экслюзионной хроматографии по размеру, имеет рН около 6,8.

11. Способ по п.1, отличающийся тем, что количество образца, в том числе конъюгата антитело-лекарственное средство, приводимого в контакт с хроматографической системой, составляет от 10 до 100 мкг.

12. Способ по п.1, отличающийся тем, что элюат, полученный при промывке смолы для экслюзионной хроматографии по размеру, вводят в масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением при скорости потока менее чем около 50 мкл/мин.

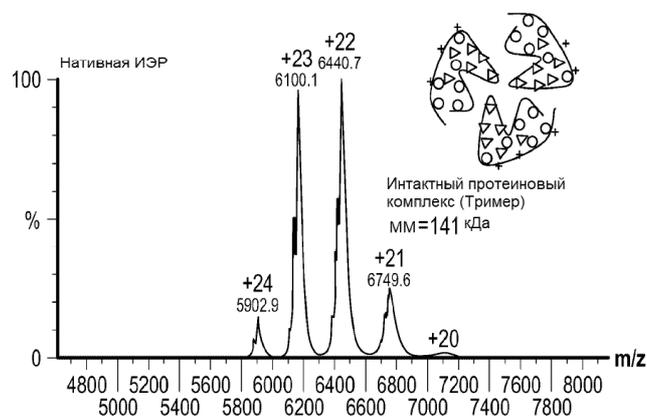
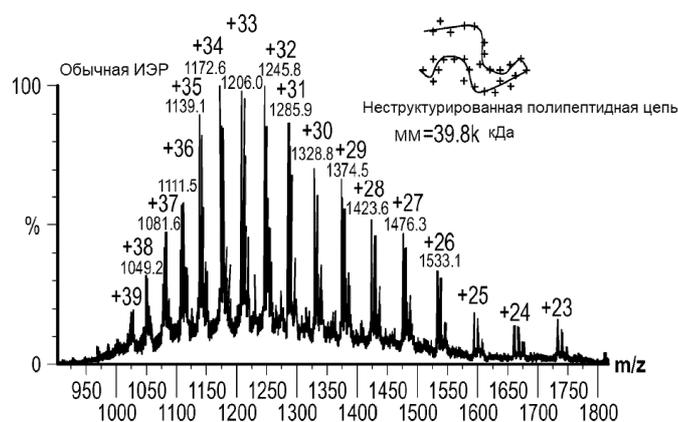
13. Способ по п.1, отличающийся тем, что элюат, полученный при промывке смолы для экслюзионной хроматографии, вводят в масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, при этом скорость потока электрораспыления в ионизации электрораспылением составляет от 10 до 50 нл/мин.

14. Способ по п.1, отличающийся тем, что элюат, полученный при промывке смолы для экслюзионной хроматографии, вводят в масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, при этом напряжение распыления при электрораспылении составляет от 0,8 до 3,0 кВ.

15. Способ по п.1, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство со сконструированными с помощью генной инженерии цистеинами.

16. Способ по п.1, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство с неспецифичными цистеинами.

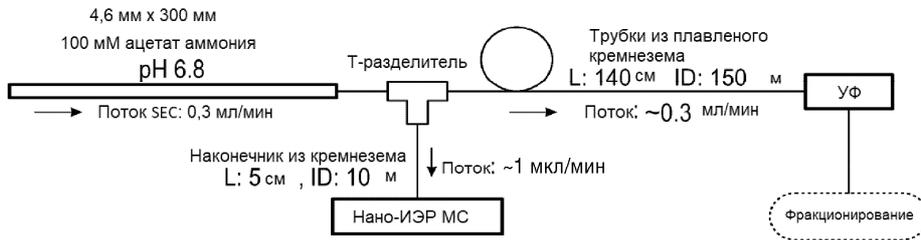
17. Способ по п.1, отличающийся тем, что характеристика конъюгата антитело-лекарственное средство включает характеристику соотношения лекарственное средство-антитело.



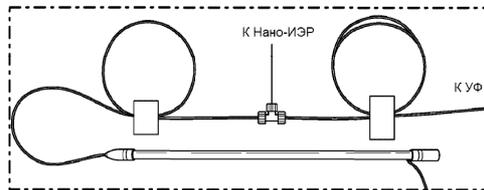
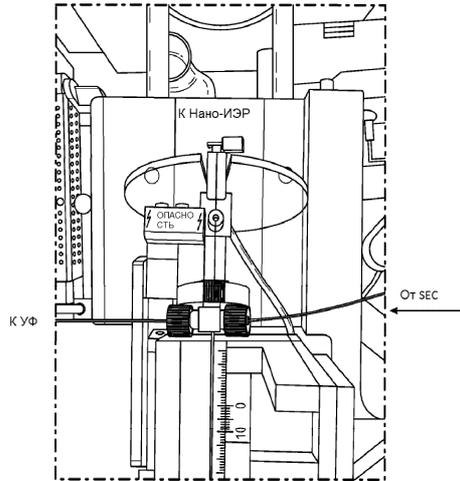
Фиг. 1



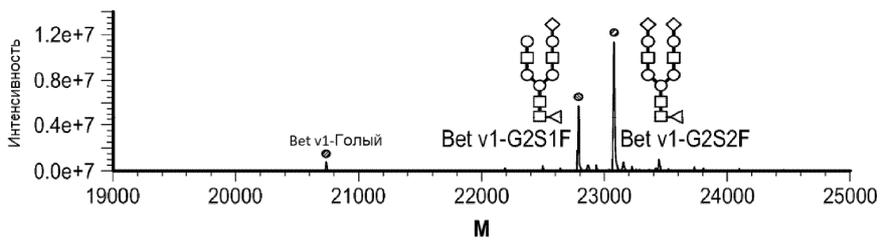
Фиг. 2



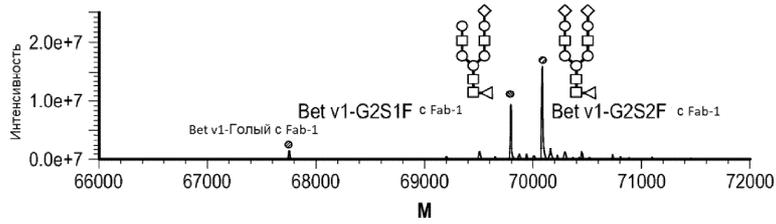
Фиг. 3



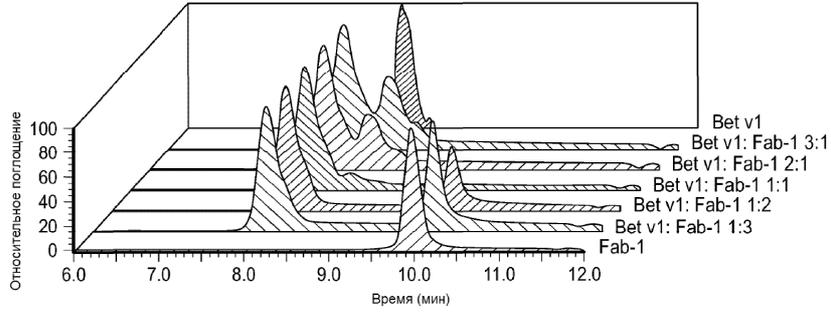
Фиг. 4



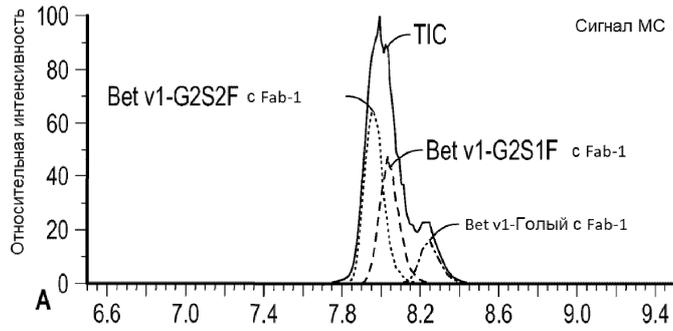
Фиг. 5А



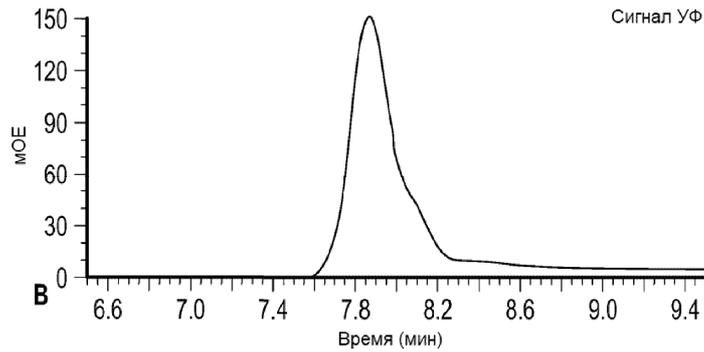
Фиг. 5В



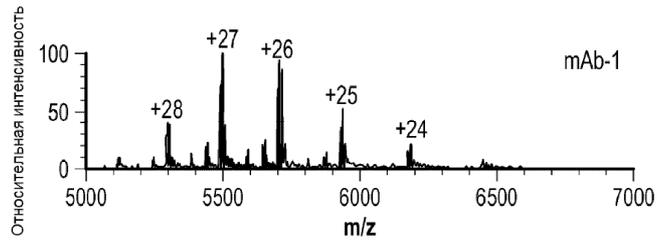
Фиг. 6



Фиг. 7А

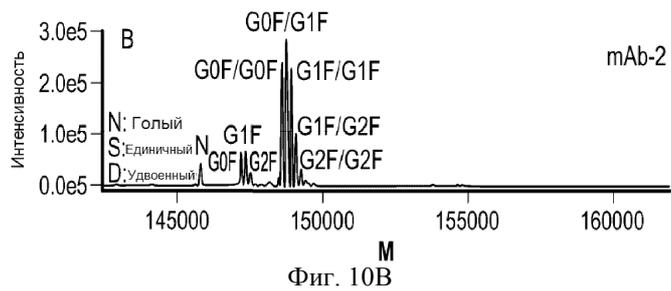
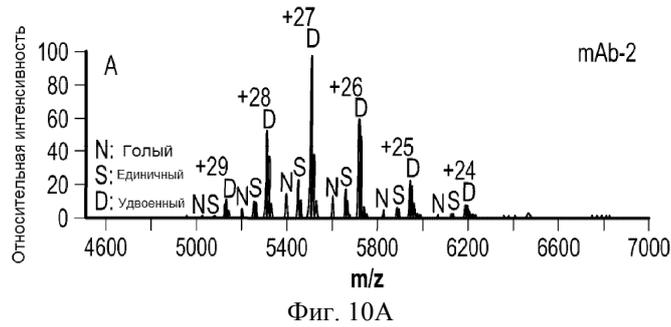
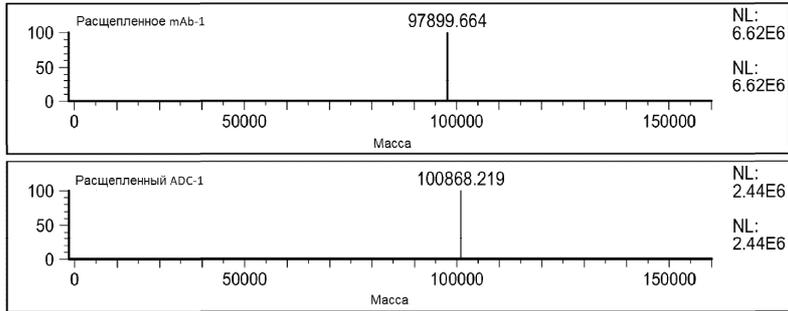
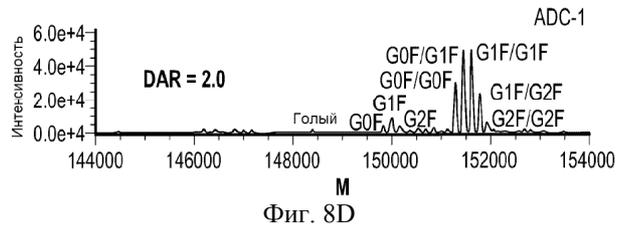
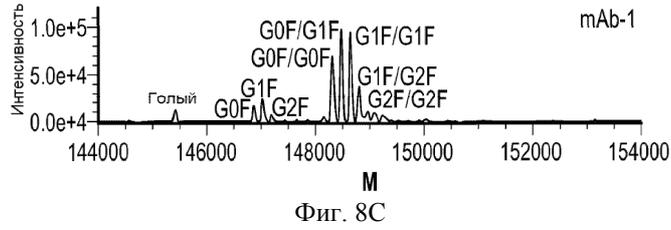
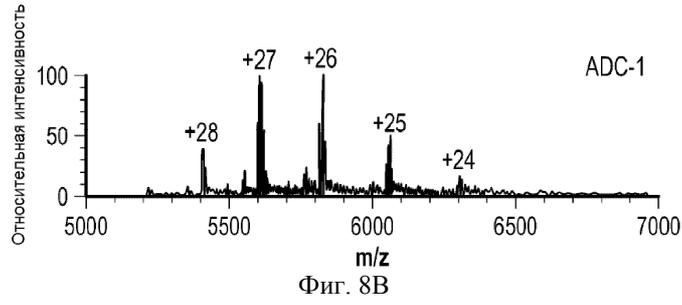


Фиг. 7В

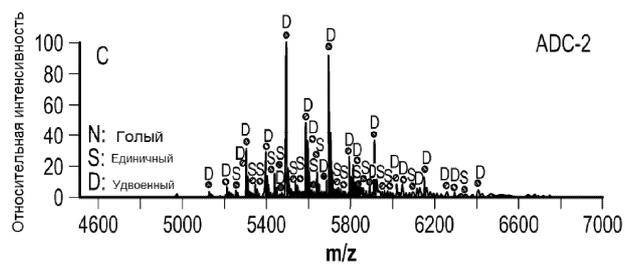


Фиг. 8А

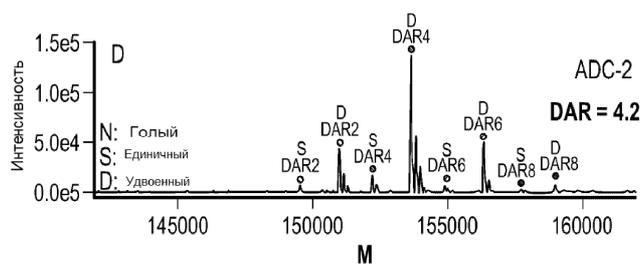
046855



046855



Фиг. 10C



Фиг. 10D



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2