

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047087**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.05.30**(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)(21) Номер заявки  
**202292177**(22) Дата подачи заявки  
**2021.01.26**


---

**(54) МУЛЬТИПЛЕКСНОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ БЕЛКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ТАНДЕМНЫХ МАССОВЫХ МЕТОК**


---

(31) **62/966,151**(32) **2020.01.27**(33) **US**(43) **2022.10.11**(86) **PCT/US2021/015146**(87) **WO 2021/154764 2021.08.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

**Мао Юань, Клейнберг Эндрю (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**(56) **WO-A1-2018170981**

UDAYANATH AICH ET AL.: "State-of-the-art technologies for rapid and high-throughput sample preparation and analysis of N-glycans from antibodies", ELECTROPHORESIS, vol. 37, № 11, 16 March 2016 (2016-03-16), pages 1468-1488, XP055658199, ISSN: 0173-0835, DOI: 10.1002/elps.201500551, the whole document, abstract

GRACE LU ET AL.: "Capillary Electrophoresis Separations of Glycans", CHEMICAL REVIEWS, vol. 118, № 17, 12 March 2018 (2018-03-12), pages 7867-7885, XP055659172, US, ISSN: 0009-2665, DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00669, the whole document, abstract

MAO YUAN ET AL.: "Isobaric Tandem Mass Tag Multiplexed Post-Translational Modification Quantitation of Biopharmaceuticals by Targeted High-Resolution Mass Spectrometry", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 92, № 14, 19 June 2020 (2020-06-19), pages 9682-9690, XP055806969, US, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/acs.analchem.0c00999, the whole document, abstract

ZHAO YUNLONG ET AL.: "Glycine additive facilitates site-specific glycosylation profiling of biopharmaceuticals by ion-pairing hydrophilic interaction chromatography mass spectrometry", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 413, № 5, 26 November 2020 (2020-11-26), pages 1267-1277, XP037373229, ISSN: 1618-2642, DOI: 10.1007/S00216-020-03089-3, the whole document, abstract

---

(57) Раскрыты способы количественного определения множества показателей качества, таких как посттрансляционные модификации, множества образцов в одном цикле масс-спектрометрии (МС), включающие приведение двух или более образцов в контакт с расщепляющим раствором в условиях, достаточных для расщепления образцов, где каждый образец расщепляется отдельно и расщепляющий раствор представляет собой буферный раствор, не содержащий трис-буфера; приведение каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт со специфическим реагентом для мечения тандемной массовой меткой (ТМТ) в условиях, достаточных для мечения пептидов в каждом из расщепленных образцов с использованием специфического реагента для мечения ТМТ; гашение мечения пептидов в каждом из двух или более расщепленных образцов; объединение равных объемов двух или более меченых расщепленных образцов в раствор одного объединенного образца; и анализ раствора одного объединенного образца с использованием нацеленного масс-спектрального анализа с обеспечением таким образом возможности количественного определения множества показателей качества двух или более образцов в одном цикле масс-спектрометрии (МС).

---

**B1****047087****047087 B1**

### Ссылка на перечень последовательностей

В настоящую заявку посредством ссылки включен перечень последовательностей, поданный в машиночитаемой форме в виде файла 10693WO01-Sequence.txt, созданного 26 января 2021 г., размером 1462 байта.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к биофармацевтическим препаратам и относится к мультиплексному количественному определению посттрансляционных модификаций белков, таких как терапевтические моноклональные антитела, с использованием тандемных массовых меток (ТМТ).

### Уровень техники

С момента первого одобрения Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) в 1986 г. рекомбинантные моноклональные антитела (mAb) стали одним из наиболее быстро растущих классов биотерапевтических препаратов для лечения различных заболеваний человека в портфеле разрабатываемых лекарственных средств и на рынке биофармацевтических препаратов благодаря их высокой специфичности, длительному периоду полужизни в кровотоке, возможности вызывать эффекторный ответ иммунных клеток и меньшему количеству побочных действий по сравнению с низкомолекулярными препаратами. На сегодняшний день около 80 лекарственных препаратов на основе mAb IgG были одобрены FDA и Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA), и более 70 находятся на поздней стадии разработки.

mAb IgG представляют собой ковалентные гетеротетрамерные белки с молекулярной массой приблизительно 150 кДа, состоящие из двух идентичных тяжелых и легких цепей, которые ковалентно связаны несколькими дисульфидными связями с образованием Y-образной структуры. Из-за своего большого размера и структурной сложности mAb подвержены широкому спектру посттрансляционных модификаций (ПТМ), таких как гликозилирование Fc, окисление метионина (Met), дезамидирование аспарагина (Asn), циклизация/изомеризация аспарагиновой кислоты (Asp), циклизация N-концевого глутамина (Gln) или глутамата (Glu), клипирование C-концевого лизина (Lys), неферментативное гликозилирование Lys и трисульфидная связь, во время культивирования клеток, очистки, приготовления лекарственного препарата и хранения. ПТМ могут быть основным источником структурной неоднородности и играть важную роль в модулировании физико-химических свойств mAb. Некоторые ПТМ, такие как гликозилирование, дезамидирование и окисление, в зависимости от расположения затронутых остатков (например, в областях, определяющих комплементарность (CDR)), могут даже оказывать пагубное влияние на стабильность, функцию, иммуногенность и фармакокинетику/фармакодинамику, которые обычно считаются критическими показателями качества (CQA) антител, подлежащими тщательному мониторингу во время разработки лекарственных средств (Wang et al., *J. Pharm. Sci.*, 2007, 96, 1-26; Manning et al., *Pharm Res.* 2010, 27, 544-557). Окисление двух консервативных остатков Met, расположенных на границе константных доменов тяжелой цепи 2 (CH2) и 3 (CH3) в большинстве антител IgG, может снижать термостабильность (Houde et al., *Mol. Cell. Proteomics.*, 2010, 9, 1716-1728), связывание белка A (Ber-tolotti-Ciarlet et al., *Mol. Immunol.*, 2009, 46, 1878-1882), связывание FcRn (Zhang et al., *Anal. Chem.*, 2014, 86, 3468-3475) и период полужизни антител IgG из кровотока (Wang et al., *Mol. Immunol.*, 2011, 48, 860-866), тогда как окисление Met или триптофана (Trp) и дезамидирование Asn в подверженных действию растворителя CDR потенциально могут влиять на связывание антигена и активность (Wei et al., *J. Pharm. Sci.*, 2009, 98, 3509-3521; Yan et al., *J. Pharm. Sci.*, 2009, 98, 3509-3521). N-связанное гликозилирование по консервативному Asn тяжелой цепи CH2 в Fc-области антител также важно для поддержания структуры и стабильности mAb и в некоторых случаях может регулировать последующие эффекторные функции, такие как комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) и антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) посредством модулирования связывания с Fc $\gamma$ -рецепторами (Jennewein, M.F., Alter, G., *Trends in Immunology.*, 2017, 38, 358-372). Следовательно, важно охарактеризовать и контролировать уровни ПТМ, особенно тех, которые считаются CQA, во время разработки, производства и хранения терапевтических антител, чтобы обеспечить качество продукта и определить любое потенциальное влияние на конечную безопасность и эффективность.

Пептидное картирование методом жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС) используется в биофармацевтической промышленности для получения характеристики терапевтических антител на молекулярном уровне (Beck et al., *Anal. Chem.*, 2013, 85, 715-736; Sandra, K. et al., *J. Chromatogr. A.*, 2014, 1335, 81-103). В этом методе используется восходящая методика, включающая ферментативное (т.е. обычно трипсиновое) расщепление белков в невосстанавливающих (пептидное картирование в невосстанавливающих условиях) или восстанавливающих (пептидное картирование в восстанавливающих условиях) условиях с последующим разделением полученных пептидов и анализом с использованием ультрафиолетового (УФ) детектирования и/или масс-спектрометрии (МС), что обеспечивает преимущества оценки структурной целостности, поддерживаемой межцепочечными и внутрицепочечными дисульфидными связями, подтверждения аминокислотной последовательности белка и обеспечения сайт-специфического количественного анализа при посттрансляционных и химических модификациях, которые могут возникнуть во время производства, обработки или хранения (Mouchahoir, T., Schiel, J.E., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2018, 410, 2111-2126).

В методе пептидного картирования на основе ЖХ-МС для анализа ПТМ количественное определение сайт-специфических ПТМ осуществляют по спектрам МС1 ферментативных гидролизатов путем расчета отношения площади пика хроматограммы выбранного иона (EIC) модифицированного пептида, содержащего ПТМ, к сумме площади пиков EIC соответствующего нативного пептида и модифицированного пептида. Несмотря на то, что оптимизированный рабочий процесс пептидного картирования может обеспечить высокий охват последовательностей и позволить эффективно охарактеризовать множество показателей (например, различные сайт-специфические ПТМ) образца антитела в одном цикле ЖХ-МС благодаря быстрому развитию инструментов ЖХ-МС и программного обеспечения для биоинформатики, это традиционный подход без использования меток для относительного количественного определения сайт-специфических ПТМ требует подготовки образцов и сбора масс-спектрометрических данных для отдельных образцов, что может занимать значительное время, затрудняя удовлетворение постоянно растущих потребностей в получении характеристики моноклональных антител в процессе разработки лекарственных средств. Недавние достижения в области технологии пептидного картирования были в основном сосредоточены на повышении эффективности подготовки образцов, например, разработке автоматизированной системы для увеличения пропускной способности или встроенной в поток системы расщепления для сокращения времени подготовки образцов (Richardson et al., Anal. Biochem., 2011, 411, 284-291; Cao et al., J. Pharm. Sci., 2019, 108, 3540-3549; и Mao et al., mAbs. 2019, 11, 767-778), однако, когда размер образца увеличивается, время работы прибора, необходимое для сбора данных ЖХ-МС образцов, также увеличивается линейным образом, что не только ограничивает общую эффективность технологического процесса пептидного картирования для получения характеристики белков, но также может привести к большой изменчивости количественного определения ПТМ в результате колебаний работы прибора, связанных со временем и температурой, аппаратных и программных сбоев прибора или нарушения стабильности при хранения образца в автоматическом пробоотборнике во время ЖХ-МС анализа гидролизатов при пептидном картировании.

#### **Краткое описание изобретения**

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ количественного определения множества показателей качества множества образцов в одном цикле масс-спектрометрии (МС), включающий приведение двух или более образцов в контакт с расщепляющим раствором в условиях, достаточных для расщепления двух или более образцов, где каждый образец расщепляется отдельно, и расщепляющий раствор представляет собой буферный раствор, не содержащий трис-буфера; приведение каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт со специфическим реагентом для мечения тандемной массовой меткой (ТМТ) в условиях, достаточных для мечения пептидов в каждом из двух или более расщепленных образцов с использованием специфического реагента для мечения ТМТ; гашение мечения пептидов в каждом из двух или более расщепленных образцов; объединение равных объемов двух или более меченых расщепленных образцов в раствор одного объединенного образца; и анализ раствора одного объединенного образца с использованием нацеленного масс-спектрального анализа, с обеспечением таким образом возможности количественного определения множества показателей качества двух или более образцов в одном цикле масс-спектрометрии (МС).

В некоторых вариантах осуществления множество показателей качества включают посттрансляционную модификацию (ПТМ).

В некоторых вариантах осуществления ПТМ включает одно или более из дезамидирования, окисления, гликирования, образования дисульфидных связей, образования N-концевого пироглутамата, удаления C-концевого лизина и гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления ПТМ включает гликозилирование.

В некоторых вариантах осуществления количественное определение множества показателей качества в одном цикле МС включает количественное определение ПТМ путем количественного определения относительного содержания ПТМ из площадей выбранных пиков полученного репортерного иона, генерированного в целевых масс-спектрах.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает приведение каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт с низкомолекулярной добавкой перед приведением каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт со специфическим реагентом для мечения ТМТ.

В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка выбрана из группы, состоящей из ВОС-У-ОН, п-крезола, гидроксифенилуксусной кислоты (НРАА), гидроксibenзойной кислоты (НВА), ацетаминофена и п-аминобензойной кислоты (РАВА).

В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка представляет собой РАВА.

В некоторых вариантах осуществления пептиды представляют собой гликопептиды.

В некоторых вариантах осуществления гликопептиды получены из моноклонального антитела.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

В некоторых вариантах осуществления два или более образцов представляют собой от 2 до 16 образцов.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение двух или более образцов для анализа.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает подготовку двух или более образцов для расщепления перед приведением двух или более образцов в контакт с расщепляющим раствором в условиях, достаточных для расщепления двух или более образцов.

В некоторых вариантах осуществления подготовка двух или более образцов перед расщеплением включает приведение каждого из двух или более образцов в контакт с денатурирующим и восстанавливающим раствором в условиях, которые обеспечивают денатурацию и восстановление образца; и приведение каждого из двух или более денатурированных и восстановленных образцов в контакт с алкилирующим раствором в условиях, которые обеспечивают алкилирование образца.

В некоторых вариантах осуществления анализ раствора одного объединенного образца с использованием нацеленного масс-спектрального анализа включает нанесение одного объединенного образца на разделительную колонку и проведение направленного масс-спектрального анализа элюированных компонентов образца.

В некоторых вариантах осуществления разделительная колонка представляет собой колонку для жидкостной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления проведение нацеленного масс-спектрального анализа элюированных компонентов образца включает применение ионизации электрораспылением для генерирования заряженных ионов из элюированных компонентов образца и измерение генерированных заряженных ионов.

В одном аспекте изобретения способ количественного определения посттрансляционных модификаций (ПТМ) множества образцов в одном цикле масс-спектрометрии (МС) включает приведение двух или более образцов в контакт с расщепляющим раствором в условиях, достаточных для расщепления двух или более образцов, где каждый образец расщепляется отдельно, и расщепляющий раствор представляет собой буферный раствор, не содержащий трис-буфера; приведение каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт с низкомолекулярной добавкой; приведение каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт со специфическим реагентом для мечения тандемной массовой меткой (ТМТ) в условиях, достаточных для мечения пептидов в каждом из двух или более расщепленных образцов с использованием специфического реагента для мечения ТМТ; гашение мечения пептидов в каждом из двух или более расщепленных образцов; объединение равных объемов двух или более меченых расщепленных образцов в раствор одного объединенного образца; и анализ раствора одного объединенного образца с использованием нацеленного масс-спектрального анализа, с обеспечением таким образом возможности количественного определения ПТМ двух или более образцов в одном цикле МС.

В некоторых вариантах осуществления ПТМ включает одно или более из дезамидирования, окисления, гликирования, образования дисульфидных связей, образования N-концевого пироглутамата, удаления C-концевого лизина и гликозилирования.

В некоторых вариантах осуществления ПТМ включают гликозилирование.

В некоторых вариантах осуществления количественное определение ПТМ включает количественное определение относительного содержания ПТМ из площадей выбранных пиков полученного репортерного иона, генерированного в целевых масс-спектрах.

В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка выбрана из группы, состоящей из ВОС-У-ОН, п-крезола, гидроксифенилуксусной кислоты (НРАА), гидроксibenзойной кислоты (НВА), ацетаминофена и п-аминобензойной кислоты (РАВА).

В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярная добавка представляет собой РАВА.

В некоторых вариантах осуществления пептиды представляют собой гликопептиды.

В некоторых вариантах осуществления гликопептиды получены из моноклонального антитела.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

В некоторых вариантах осуществления два или более образцов представляют собой от 2 до 16 образцов.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение двух или более образцов для анализа.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает подготовку двух или более образцов для расщепления перед приведением двух или более образцов в контакт с расщепляющим раствором в условиях, достаточных для расщепления двух или более образцов.

В некоторых вариантах осуществления подготовка двух или более образцов перед расщеплением включают приведение каждого из двух или более образцов в контакт с денатурирующим и восстанавливающим раствором в условиях, которые обеспечивают денатурацию и восстановление образца; и приведение каждого из двух или более денатурированных и восстановленных образцов в контакт с алкилирующим раствором в условиях, которые обеспечивают алкилирование образца.

В некоторых вариантах осуществления анализ раствора одного объединенного образца с

использованием нацеленного масс-спектрального анализа включает нанесение одного объединенного образца на разделительную колонку и проведение направленного масс-спектрального анализа элюированных компонентов образца.

В некоторых вариантах осуществления разделительная колонка представляет собой колонку для жидкостной хроматографии.

В некоторых вариантах осуществления проведение нацеленного масс-спектрального анализа элюированных компонентов образца включает применение ионизации электрораспылением для генерирования заряженных ионов из элюированных компонентов образца и измерение генерированных заряженных ионов.

В различных вариантах реализации любые из признаков или компонентов вариантов осуществления, обсуждаемых выше или далее в настоящем изобретении, можно комбинировать, и такие комбинации входят в объем настоящего изобретения. Любое конкретное значение, обсуждаемое выше или далее в настоящем изобретении, может быть комбинировано с другим взаимосвязанным значением, обсуждаемым выше или далее в настоящем изобретении, для определения диапазона, в котором указанные значения представляют собой верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны и все значения, входящие в такие диапазоны, входят в объем настоящего изобретения. Каждое из значений, обсуждаемых выше или далее в настоящем изобретении, может быть указано с отклонением в 1, 5, 10 или 20%. Например, концентрация 10 мМ может быть указана как  $10 \pm 0,1$  мМ (отклонение в 1%),  $10 \pm 0,5$  мМ (отклонение в 5%),  $10 \pm 1$  мМ (отклонение в 10%) или  $10 \pm 2$  мМ (отклонение в 20%). Другие варианты осуществления будут очевидны после прочтения следующего подробного описания изобретения.

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

На фиг. 1А и 1В показано влияние NCE (35-70) на содержание репортерного иона двух репрезентативных меченых ТМТ пептидов в mAb-A (фиг. 1А) и на относительное количественное определение различных типов ПТМ в mAb-A наряду с количественными результатами по ПТМ, полученными с использованием традиционного подхода (фиг. 1В). На фиг. 1В порядок столбцов слева направо для каждой сайт-специфической ПТМ представляет собой следующий: контроль (без ТМТ), NCE 35, NCE 40, NCE 50, NCE 55, NCE 60, NCE 70.

На фиг. 2А и 2В показано влияние NCE (35-100) на количественное определение гликозилирования Lys в mAb-B (фиг. 2А) и влияние NCE (27-100) на количественное определение пироглутамата при N-концевом Glu в mAb-B (фиг. 2В). Черные планки погрешностей: среднеквадратическое отклонение процентов ПТМ в двух параллельных анализах. Порядок столбцов на фиг. 2А (слева направо): контроль (без ТМТ), NCE 35, NCE 40, NCE 50, NCE 55, NCE 60, NCE 70, NCE 80, NCE 90 и NCE 100. Порядок столбцов на фиг. 2В (слева направо): контроль (без ТМТ), NCE 27, NCE 30, NCE 35, NCE 40, NCE 50, NCE 55, NCE 60, NCE 70, NCE 80, NCE 90 и NCE 100.

На фиг. 3А и 3В показано влияние NCE (35-80) на количественную оценку трисульфидных связей в IgG1 mAb-C (фиг. 3А) и IgG4 mAb-D (фиг. 3В) наряду с количественными результатами, полученными с использованием традиционного подхода.

На фиг. 4А показана оценка относительного количественного определения четырех ПТМ в mAb-E в шести каналах ТМТ при соотношении 1:1:1:1:1:1. Объединенные образцы, меченые ТМТ, были получены из трех определений и проанализированы с использованием ЖХ-МС/МС в двух параллельных анализах. Ящичковые диаграммы показывают среднее значение (более крупная точка), процентиль от 25- до 75-го (ящик) и процентиль от 5- до 95-го (усы). Проценты ПТМ, рассчитанные с использованием традиционного подхода, обозначены пунктирными линиями.

На фиг. 4В показана оценка воспроизводимости относительного количественного определения четырех ПТМ в mAb-E в шести каналах ТМТ при соотношении 1:1:1:1:1:1. Объединенные образцы, меченые ТМТ, были получены из трех определений и проанализированы с использованием ЖХ-МС/МС в двух параллельных анализах. Ящичковые диаграммы показывают среднее значение (точка), 25- и 75-й процентиль (ящик) и 5- и 95-й процентиль (усы). Проценты ПТМ, рассчитанные с использованием традиционного подхода, обозначены пунктирными линиями.

На фиг. 5 показана оценка чувствительности относительного количественного определения четырех ПТМ в mAb-A в шести каналах ТМТ при соотношении 1:2:4:8:16:32. Объединенные образцы, меченые ТМТ, были получены из трех определений и проанализированы с использованием ЖХ-МС/МС в двух параллельных анализах. Ящичковые диаграммы показывают среднее значение (точка), 25- и 75-й процентиль (ящик) и 5- и 95-й процентиль (усы). Проценты ПТМ, рассчитанные с использованием традиционного подхода, обозначены пунктирными линиями.

На фиг. 6 показано количественное определение ПТМ в образцах mAb-A, подвергнутых принудительной деградации, с использованием подхода на основе целевой МС/МС (сплошные столбцы) и традиционного подхода (полосатые столбцы). Черные планки погрешностей: среднеквадратическое отклонение процентов ПТМ в двух параллельных анализах. Порядок столбцов слева направо для каждой сайт-специфической ПТМ представляет собой: mAb-A-S0 (без ТМТ), mAb-A-S0 (ТМТ-126), mAb-A-S1 (без ТМТ), mAb-A-S1 (ТМТ-127), mAb-A-S2 (без ТМТ), mAb-A-S2 (ТМТ-128), mAb-A-S3 (без ТМТ),

mAb-A-S3 (TMT-129), mAb-A-S4 (без TMT), mAb-A-S4 (TMT-130), mAb-A-S5 (без TMT), mAb-A-S5 (TMT-131).

На фиг. 7А и 7В показано количественное определение ПТМ образцов для оценки сопоставимости mAb-F, изготовленных на различных технологических площадках, с использованием подхода на основе целевой МС/МС (сплошные столбцы) и традиционного подхода (полосатые столбцы). На фиг. 7А показаны ПТМ с уровнями >2,5%, а на фиг. 7В показаны ПТМ с уровнями ≤2,5%. Черные планки погрешностей: среднеквадратическое отклонение процентов ПТМ в двух параллельных анализах. Порядок столбцов слева направо для каждой сайт-специфической ПТМ для обеих фиг. 7А и 7В представляет собой следующий: mAb-F-P1 (без TMT), mAb-F-P1 (TMT-128), mAb-F-P2 (без TMT), mAb-F-P2 (TMT-129), mAb-F-P3 (без TMT), mAb-F-P3 (TMT-130), mAb-F-P4 (без TMT), mAb-F-P4 (TMT-131).

На фиг. 8 показано количественное определение трисульфидных связей в стандартных образцах для оценки трисульфидных связей mAb-E с использованием подхода на основе целевой МС/МС (сплошные столбцы) и традиционного подхода (полосатые столбцы). Трисульфидные стандарты mAb-E с различными уровнями трисульфидных связей были получены путем смешивания образца, подвергнутого воздействию H<sub>2</sub>S, и эталонного стандартного образца в различных соотношениях. mAb-E-TS0 (100:0), mAb-E-TS1 (75:25), mAb-E-TS2 (50:50), mAb-E-TS3 (25:75) и mAb-E-TS4 (0:100).

На фиг. 9 показано влияние различных низкомолекулярных добавок во время мечения TMT на относительное содержание меченых TMT фрагментов с разными метками TMT и разными изоформами для пептида WQQG (остатки 1-4 SEQ ID NO: 3) и пептида TTPP (остатки 1-4 SEQ ID NO: 4). Сайты мечения TMT у каждого фрагмента были выделены (выделение жирным шрифтом). Вос-Y: N-(трет-бутоксикарбонил)-тирозин; HPAА: 4-гидроксифенилуксусная кислота; HBA: 4-гидроксибензойная кислота; ПАВА: 4-аминобензойная кислота.

На фиг. 10 показана структура иллюстративной тандемной массовой метки и иллюстративных реагентов тандемной массовой метки.

На фиг. 11 показано химические структуры иллюстративных реагентов, предотвращающих избыточное мечение - Вос-Y-OH, п-крезола, гидроксифенилуксусной кислоты (HPAA), гидроксibenзойной кислоты (HBA), ацетаминифена и/или п-аминобензойной кислоты (ПАВА).

#### Подробное описание изобретения

Обращаясь к описанию настоящего изобретения, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и условиями экспериментов, так как указанные способы и условия могут варьироваться. Также следует исходить из того, что используемая в настоящем изобретении терминология предназначена только для описания частных вариантов осуществления и не подразумевает ограничительного характера, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты осуществления или признаки вариантов осуществления могут быть комбинированы друг с другом, и такие комбинации явным образом входят в объем настоящего изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем изобретении, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. В контексте настоящего изобретения термин "приблизительно" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что это значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в контексте настоящего изобретения выражение "приблизительно 100" включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые методы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем изобретении, могут использоваться при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения, предпочтительные методы и материалы описаны далее. Содержание всех патентов, заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящем описании, включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Сокращения, используемые в настоящем изобретении.

ACN: ацетонитрил;

ADCC: антителозависимая клеточная цитотоксичность;

Asn: аспарагин;

AUC: площадь под кривой;

Вос-Y: N-(трет-бутоксикарбонил)-тирозин;

CDC: комплемент-зависимая цитотоксичность;

CDR: область, определяющая комплементарность;

CQA: критические показатели качества;

CV: коэффициент вариации;

EIC: хроматограмма выбранного иона;

ELISA: твердофазный иммуноферментный анализ;

ESI-МС: масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением;

FA: муравьиная кислота;

FDA: управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов;

FLR: флуоресцентное детектирование;  
 HBA: 4-гидроксibenзойная кислота;  
 HC: тяжелая цепь;  
 HPLC: жидкостная хроматография гидрофильного взаимодействия;  
 HPAА: 4-гидроксибензилуксусная кислота;  
 IgG: иммуноглобулин G;  
 LC: легкая цепь;  
 ЖХ-МС: жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией;  
 mAb: моноклональное антитело;  
 Met: метионин;  
 MS: масс-спектрометрия;  
 MW: молекулярная масса;  
 NCE: нормированная энергия столкновения;  
 ПАВА: 4-аминобензойная кислота;  
 ФК: фармакокинетика;  
 PROCA: прокаинамид;  
 PQA: показатель качества продукта;  
 ПТМ: посттрансляционная модификация;  
 ОФ-ЖХ-МС/МС: обращенно-фазовая жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией;  
 ТФЭ: твердофазная экстракция;  
 ТСЕР-НСl: трис(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид ;  
 TFA: трифторуксусная кислота;  
 TMT: tandemная массовая метка;  
 УФ: ультрафиолет.  
 Определения.

Термин "антитело" в контексте настоящего изобретения относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями (т.е. "молекулам полноразмерного антитела"), а также их мультимерам (например, IgM) или их антигенсвязывающим фрагментам. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V<sub>H</sub>") и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>). В различных вариантах осуществления тяжелая цепь может относиться к изотипу IgG. В некоторых случаях тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь относится к изотипу IgG1 или IgG4, необязательно включая химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи ("LCVR" или "V<sub>L</sub>") и константной области легкой цепи (C<sub>L</sub>). В областях V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> можно дополнительно выделить области гиперварибельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые перемежаются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными методами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Обзор структуры антител см. в источниках Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) Dev., Comp. Immunol., 55-77 (2003); и M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1), Surv. Immunol. Res., 27-42 (1983).

Термин "антитело" также охватывает "биспецифичное антитело", которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с несколькими разными эпитопами. Одна половина биспецифичного антитела, которая включает одну тяжелую цепь и одну легкую цепь и шесть CDR, связывается с одним антигеном или эпитопом, а другая половина антитела связывается с другим антигеном или эпитопом. В некоторых случаях биспецифичное антитело может связывать один и тот же антиген, но разные эпитопы или неперекрывающиеся эпитопы. В некоторых случаях обе половины биспецифичного антитела имеют идентичные легкие цепи, сохраняя при этом двойную специфичность. Биспецифичные антитела в общих чертах описаны в публикации патентной заявки США № 2010/0331527 (30 декабря 2010 г.).

Термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или "фрагмент антитела") относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) Fab-фрагмент - одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент - двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; (v) фрагмент dAb (Ward et al.

(1989), Nature, 241:544-546), состоящий из домена VH; (vi) выделенную CDR; и (vii) scFv, состоящий из двух доменов Fv-фрагмента, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием единой белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются, образуя одновалентные молекулы. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином "антитело" (см., например, источники Holliger et al. (1993), 90, PNAS U.S.A., 6444-6448; и Poljak et al. (1994), 2, Structure, 1121-1123).

Кроме того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием стандартных технологий рекомбинантной ДНК, широко известных в данной области техники (см. источник Sambrook et al., 1989). В данной области техники также известны способы получения человеческих антител у трансгенных мышей. С использованием технологии VELOCIMMUNE® (см., например, патент США № 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител, сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела к желаемому антигену, имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой содержит человеческие переменные области тяжелой и легкой цепи, функционально связанные с эндогенными локусами мышинной константной области, так что мышь продуцирует антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепи. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Подразумевается, что термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие mAb согласно изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. В то же время термин "человеческое антитело" в контексте настоящего изобретения не предполагает включение mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были привиты на человеческие последовательности FR. Указанный термин включает антитела, рекомбинантно продуцированные в организме млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Указанный термин не предполагает включение антител, выделенных из или полученных в организме субъекта-человека.

В контексте настоящего изобретения термин "субъект" относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, нуждающемуся, например, в облегчении, предупреждении и/или лечении заболевания или расстройства.

"Посттрансляционная модификация" (ПТМ) относится к ковалентной модификации белков после биосинтеза белка. Посттрансляционные модификации могут иметь место на боковых цепях аминокислот или на С- или N-концах белка. Примеры посттрансляционных модификаций антител включают дезамидирование, окисление, гликирование, образование дисульфидных связей, образование N-концевого пироглутамата, удаление С-концевого лизина и гликозилирование.

Термин "гандемная массовая метка" (ТМТ) представляет собой химическую метку, используемую для количественного определения и идентификации биологических макромолекул, таких как белки, пептиды и нуклеиновые кислоты, на основе масс-спектрометрии (МС). ТМТ принадлежит к семейству реагентов, называемых изобарическими массовыми метками. Они представляют собой альтернативу количественному определению на основе геля или антител, но также могут применяться в сочетании с этими и другими методами. Помимо помощи в количественном определении белка, метки ТМТ также могут повысить чувствительность обнаружения некоторых высокогидрофильных аналитов, таких как фосфопептиды, в анализах ОФ-ВЭЖХ-МС. В настоящее время коммерчески доступны шесть разновидностей ТМТ (Thermo Fisher Scientific, Алта, Массачусетс, США): ТМТzero - коровая структура без изотопного замещения; ТМТduplex - изобарическая пара массовых меток с одним изотопным замещением; ТМТsixplex - изобарический набор из шести массовых меток с пятью изотопными замещениями; ТМТ 10-plex - набор из 10 изотопных массовых меток, в которых используется репортерная область ТМТsixplex, но изотоп другого элемента для создания разницы масс в 0,0063 Да, ТМТpro - версия 16-plex с репортером и нормализатором массы, отличным от исходной ТМТ, и ТМТzero. Метки содержат четыре области, а именно область репортера массы (M), область расщепляемого линкера (F), область нормирования массы (N) и группу, реагирующую с белком (R). Химические структуры всех меток идентичны, но каждая из них содержит изотопы, замещающие в различных положениях, так что области репортера массы и нормирования массы имеют разные молекулярные массы в каждой метке. В совокупности области M-F-N-R меток имеют одинаковую общую молекулярную массу и структуру, поэтому при хроматографическом или электрофоретическом

разделении и в режиме одноступенчатой МС молекулы, меченые разными метками, неразличимы. При фрагментации в режиме МС/МС информацию о последовательности получают из фрагментации пептидного остова, и одновременно получают данные количественного определения из фрагментации меток, дающей масс-репортерные ионы.

В контексте настоящего изобретения термин "гликопептид/гликопротеин" представляет собой модифицированный пептид/белок во время или после их синтеза с ковалентно связанными углеводами или гликаном. В отдельных вариантах осуществления гликопептид получают из моноклонального антитела, например, из протеазного гидролизата моноклонального антитела.

В контексте настоящего изобретения термин "гликан" представляет собой соединение, содержащее одно или более сахарных звеньев, которые обычно включают глюкозу (Glc), галактозу (Gal), маннозу (Man), фукозу (Fuc), N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилнейраминую кислоту (NeuNAc) (Frank Kjeldsen et al., Anal. Chem., 2003, 75, 2355-2361). Гликановый фрагмент в гликопротеине, таком как моноклональное антитело, является важной особенностью для определения его функции или клеточной локализации. Например, определенное моноклональное антитело модифицировано определенным гликановым фрагментом.

В контексте настоящего изобретения термин "образец" относится к смеси молекул, которая содержит по меньшей мере молекулу анализируемого вещества, например, гликопептид, например, полученный из моноклонального антитела, который подвергается манипуляции в соответствии со способами согласно изобретению, включая, например, разделение, анализ, экстракцию, концентрирование или профилирование.

В контексте настоящего изобретения термины "анализ" или "проведение анализа" используются взаимозаменяемо и относятся к любому из различных методов разделения, обнаружения, выделения, очистки, солиubilизации, обнаружения и/или получения характеристики представляющих интерес молекул (например, пептидов). Примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, твердофазную экстракцию, твердофазную микроэкстракцию, электрофорез, масс-спектрометрию, например, ESI-МС (масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением), SPE HILIC (жидкостная хроматография гидрофильного взаимодействия с твердофазной экстракцией) или MALDI-MS (масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), жидкостную хроматографию, например, высокоэффективную, например, обращенно-фазовую, нормально-фазовую или эксклюзионную, ион-парную жидкостную хроматографию, жидкостно-жидкостную экстракцию, например, ускоренную жидкостную экстракцию, сверхкритическую флюидную экстракцию, микроволновую экстракцию, мембранную экстракцию, экстракцию в аппарате Сокслета, осаждение, осветление, электрохимическое обнаружение, окрашивание, элементный анализ, деградацию по Эдмунду, ядерный магнитный резонанс, инфракрасный спектральный анализ, проточно-инжекционный анализ, капиллярную электрохроматографию, УФ-детектирование и их комбинации.

Термин "профилирование" в контексте настоящего изобретения относится к любому из различных методов анализа, которые используются в комбинации для определения содержания, состава или характеристического соотношения белков, таких как пептид, в образце.

"Приведение в контакт" в контексте настоящего изобретения включает соединение по меньшей мере двух веществ в растворе или твердой фазе.

"Целевая масс-спектрометрия" в контексте настоящего изобретения представляет собой метод масс-спектрометрии, в котором используется множество стадий тандемной масс-спектрометрии ( $MS_n$  с  $n=2$  или 3) для ионов определенной массы ( $m/z$ ) в определенное время. Значения  $m/z$  и времени определены в списке включения, полученном на основе предыдущего анализа.

"Тандемная масс-спектрометрия", также известная как МС/МС или  $MS^2$ , представляет собой метод инструментального анализа, при котором два или более масс-спектрометров соединяют друг с другом с использованием дополнительной стадии реакции для увеличения их способности анализировать химические образцы. Обычно тандемную МС применяют для анализа биомолекул, таких как белки и пептиды. Молекулы отдельно взятого образца ионизируются, и первый спектрометр (обозначаемый  $MS_1$ ) разделяет эти ионы по их отношению массы к заряду (часто обозначаемому как  $m/z$  или  $m/Q$ ). Ионы с определенным отношением  $m/z$ , поступающие из  $MS_1$ , отбираются, а затем расщепляются на более мелкие фрагментные ионы, например, путем диссоциации, вызванной столкновением, ион-молекулярной реакции или фотодиссоциации. Эти фрагменты затем вводятся во второй масс-спектрометр ( $MS_2$ ), который, в свою очередь, разделяет фрагменты по их отношению  $m/z$  и осуществляет их детекцию. Стадия фрагментации позволяет идентифицировать и разделять ионы, которые имеют очень близкие отношения  $m/z$ , в обычных масс-спектрометрах.

Общее описание.

Пептидное картирование в сочетании с жидкостной хроматографией с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС) стало ключевым аналитическим методом для количественного определения показателей качества (например, посттрансляционных модификаций (ПТМ)) моноклональных антител во время разработки лекарственных средств. Тем не менее традиционный безметочный подход к относительному количественному определению ПТМ требует большого количества времени работы

прибора для сбора данных ЖХ-МС отдельных расщепленных образцов, что ограничивает эффективность метода пептидного картирования, особенно с учетом постоянно растущей потребности в получении характеристики белков.

Таким образом, существует потребность в способах получения характеристики белков с повышенной эффективностью. Раскрытое изобретение удовлетворяет эту потребность.

В настоящем изобретении раскрыт новый подход, основанный на тандемной массовой метке (ТМТ), в сочетании с целевой масс-спектрометрией для мультиплексного сайт-специфического количественного определения ПТМ белков, включая моноклональные антитела. Этот новый способ основан на исследованиях, о которых сообщается в настоящем изобретении, в которых авторы изобретения неожиданно обнаружили, что этот подход позволяет проводить одновременное количественное определение показателей качества (например, ПТМ) для множества образцов в одном цикле ЖХ-МС. В частности, с использованием этого способа множество образцов расщепленных антител химически метят вариантами тандемных массовых меток, объединяют в равном объеме, а затем анализируют с использованием целевой масс-спектрометрии. Дифференцированно меченые пептиды неразличимы в полном МС спектре интактных пептидов из-за одинаковой молекулярной структуры и массы каждого варианта, но каждый меченый вариант пептида дает уникальный "репортерный ион" в спектре МС/МС при фрагментации внутри масс-спектрометра, таким образом, позволяя различать пептид в разных образцах и отображая содержание пептида в соответствующем образце. Относительное содержание ПТМ в каждом образце количественно определяют по площадям выбранных пиков полученного репортерного иона, генерированного из соответствующих дифференцированно меченых нативных и модифицированных пептидов в спектрах целевой МС/МС, что позволяет одновременно количественно определять множество показателей качества (например, ПТМ) для множества образцов, например, до 16-плексного определения, что обусловлено текущей способностью мультиплексирования коммерчески доступного реагента ТМТ, в одном цикле ЖХ-МС, что обеспечивает значительное сокращение времени сбора данных и варьирования результатов количественного определения ПТМ от цикла к циклу.

В некоторых вариантах осуществления способ включает получение ТМТ-пептидов. В некоторых вариантах осуществления подготовка образца включает приведение образца в контакт с денатурирующим и восстанавливающим раствором в условиях, которые обеспечивают денатурацию и восстановление образца; приведение денатурированного и восстановленного образца в контакт с алкилирующим раствором в условиях, которые обеспечивают алкилирование образца; приведение алкилированного образца в контакт с расщепляющим раствором в условиях, которые обеспечивают расщепление образца и мечение ТМТ; и приведение расщепленного образца в контакт с гасящим раствором в условиях, которые останавливают расщепление образца. Полученные ТМТ-пептиды затем могут быть проанализированы, например, с использованием ЖХ-МС.

В некоторых вариантах осуществления приведение образца в контакт с расщепляющим раствором в условиях, которые обеспечивают расщепление, включает следование стандартному протоколу расщепления, за исключением того, что его проводят в буфере, не содержащем трис-буфера, например, в натрий-фосфатном буфере (PBS), pH от 7,5 до 8. В некоторых вариантах осуществления pH раствора PBS регулируют перед добавлением реагента ТМТ в расщепляющий раствор. Наборы тандемных массовых меток (ТМТ) представляют собой реагенты, которые легко реагируют с пептидами (N-концом и лизином, любым основным  $\text{NH}_2$ ); имеют эквивалентную молекулярную массу (одинаковую массу МС1); и генерируют разные репортерные фрагментные ионы МС2 из-за распределения тяжелых атомов вокруг каждой метки. Иллюстративные ТМТ представлены на фиг. 10 и коммерчески доступны от Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США). Хотя известно, что коммерчески доступные ТМТ реагируют только с  $\text{NH}_2$ -группами (N-конец, лизин), авторы настоящего изобретения обнаружили, что ТМТ также могут в значительной степени реагировать с OH-группами (тирозин, треонин, серин). Эта реакционная способность вызвала сложности, поскольку усложняла интегрирование, расщепляя каждый пептид на множество форм, уменьшая сигнал каждого пика и приводя к избыточному мечению ТМТ. Раскрытый в настоящем изобретении способ устраняет эти ограничения путем добавления низкомолекулярной добавки в высокой концентрации (например, 100 моль низкомолекулярной добавки/моль пептида), что позволяет ТМТ по-прежнему быстро реагировать с  $\text{NH}_2$ -группами пептидов, но перенаправляет избыток ТМТ от пептидов, что позволяет большинству ТМТ-пептидов существовать в одной форме и легче интегрироваться. В некоторых примерах эта низкомолекулярная добавка представляет собой ВОС-У-ОН, п-крезол, гидроксифенилуксусную кислоту (НРАА), гидроксibenзойную кислоту (НВА), ацетаминофен и/или п-аминобензойную кислоту (РАВА). Химические структуры этих реагентов представлены на фиг. 11. В некоторых вариантах осуществления способ включает добавление низкомолекулярной добавки к образцу гидролизата перед добавлением каждого реагента ТМТ. Каждый реагент ТМТ, такой как коммерчески доступные реагенты ТМТ от Thermo Fisher Scientific, растворяют в ACN, добавляют к каждому образцу белка и оставляют для инкубации, например, при комнатной температуре в течение 1 ч. Все реакции гасят, например гасят до pH менее 4 перед объединением в один образец, и затем оценивают с использованием ЖХ-МС. В некоторых вариантах осуществления способ включает подготовку образца

для ввода пробы для ЖХ и его оценку путем проведения целевой МС2.

Раскрытый в настоящем изобретении способ может быть использован с пептидным картированием в восстанавливающих (% ПТМ) и невосстанавливающих (% трисульфидных связей) условиях. В различных вариантах осуществления для пептидного картирования в невосстанавливающих условиях ингибитор избыточного мечения, такой как РАВА, не требуется, поскольку невосстановленные пептиды не подвержены избыточному мечению.

В некоторых вариантах осуществления образец содержит пептиды. Например, образец включает пептиды с ПТМ. В некоторых вариантах осуществления пептиды представляют собой гликопептиды, такие как гликопептиды, полученные из моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой моноклональное антитело, а расщепляющий раствор содержит одну или более протеаз, таких как трипсин. В некоторых примерах способ применяют для получения характеристики/анализа гликопептидов, таких как гликопептиды, полученные из моноклонального антитела, такого как антитело, которое было расщеплено одной или более протеазами. Например, способы могут применяться для характеристики гликозилирования белков, например, терапевтических препаратов моноклональных антител (mAb). В отдельных вариантах осуществления образцы на любой промежуточной стадии могут быть концентрированы, разбавлены, обессолены и т.п.

В различных вариантах осуществления разделительная колонка представляет собой разделительную колонку для жидкостной хроматографии (ЖХ). Жидкостная хроматография, включая ВЭЖХ, может применяться для анализа пептидов, включая моноклональные антитела. Для изучения этих структур могут быть использованы различные виды жидкостной хроматографии, включая анионообменную хроматографию, обращенно-фазовую ВЭЖХ, эксклюзионную хроматографию, высокоэффективную анионообменную хроматографию и нормально-фазовую (НФ) хроматографию, включая НФ-ВЭЖХ (см., например, источник Alpert et al., J. Chromatogr. A, 676:191-202 (1994)). Хроматография гидрофильного взаимодействия (HILIC) представляет собой вариант НФ-ВЭЖХ, который можно проводить на частично водных подвижных фазах, что позволяет разделять пептиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и многие белки в нормальной фазе. Порядок элюирования для HILIC представляет собой от наименее полярного до наиболее полярного, в противоположность порядку в обращенно-фазовой ВЭЖХ. ВЭЖХ может быть проведена, например, на системе ВЭЖХ от Waters (например, система ВЭЖХ Waters 2695 Alliance), Agilent, Perkin Elmer, Gilson и т.д.

В некоторых вариантах осуществления анализ ЖХ-МС/МС проводят с использованием колонки ACQUITY UPLC peptide VEN C18. Температуру колонки можно поддерживать на постоянном уровне в течение всего цикла хроматографии, например, с использованием промышленного нагревателя колонки. В некоторых вариантах осуществления колонку поддерживают при температуре от приблизительно 18°C до приблизительно 70°C, например, от приблизительно 30°C до приблизительно 60°C, от приблизительно 40°C до приблизительно 50°C, например, при приблизительно 20°C, приблизительно 25°C, приблизительно 30°C, приблизительно 35°C, приблизительно 40°C, приблизительно 45°C, приблизительно 50°C, приблизительно 55°C, приблизительно 60°C, приблизительно 65°C или приблизительно 70°C. В некоторых вариантах осуществления температура колонки составляет приблизительно 40°C. В некоторых вариантах осуществления время анализа может составлять от приблизительно 15 мин до приблизительно 240 мин, например от приблизительно 20 мин до приблизительно 70 мин, от приблизительно 30 мин до приблизительно 60 мин, от приблизительно 40 мин до приблизительно 90 мин, от приблизительно 50 мин до приблизительно 100 мин, от приблизительно 60 мин до приблизительно 120 мин, от приблизительно 50 мин до приблизительно 80 мин. После ЖХ элюент затем подвергают анализу МС/МС.

В некоторых вариантах осуществления, например, для целевого или нецелевого анализа ЖХ-МС/МС, аликвоту каждого образца, меченого ТМТ, разделяют на колонке ACQUITY UPLC peptide VEN C18. Затем элюент подвергают электрораспылению и анализируют с использованием гибридного масс-спектрометра Q-Exactive Plus с HCD, используемого для фрагментации пептидов в экспериментах МС/МС. Целевой список, содержащий триггерное m/z, z, целевое окно времени удерживания и энергию столкновения меченых ТМТ нативных и модифицированных пептидов, загружают в список включения, чтобы управлять анализом МС/МС предшественников, обнаруженных в обзорных сканированиях МС1. Затем определяют пептид и идентифицируют ПТМ. В некоторых вариантах осуществления процент каждой ПТМ рассчитывают с использованием площади пика на хроматограмме выбранного иона (EIC) модифицированного пептида относительно суммы площадей пиков модифицированного и нативного пептидов.

### Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы согласно изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают созданным ими

изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых числовых параметров (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать возможность некоторых погрешностей эксперимента и отклонений. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1. Материалы и реагенты.

Все человеческие моноклональные антитела IgG1 и IgG4 (mAb-A, mAb-B, mAb-C, mAb-D и mAb-E) в этом исследовании были произведены в Regeneron (Тарритаун, Нью-Йорк). Образцы для оценки стабильности mAb-A были созданы путем инкубации контрольного образца в различных стрессовых условиях и помечены как mAb-A-S0 (контроль), mAb-A-S1 (T=45°C, t=28 дней), mAb-A-S2 (T=25°C, t=6 мес) и mAb-A-S3 (T=5°C, t=24 мес) соответственно. Образцы для оценки сопоставимости mAb-B были изготовлены на четырех различных технологических площадках и обозначены как mAb-B-P1, mAb-B-P2, mAb-B-P3 и mAb-B-P4 соответственно. Трисульфидные стандарты mAb-E с различными уровнями трисульфидных связей были получены путем смешивания образца, подвергнутого воздействию H<sub>2</sub>S, и эталонного стандартного образца в различных соотношениях, и обозначены как mAb-E-TS0 (100:0), mAb-E-TS1 (75:25), mAb-E-TS2 (50:50), mAb-E-TS3 (25:75) и mAb-E-TS4 (0:100) соответственно. Пептид-N-гликозидаза F Rapid (PNGаза F Rapid) с 5-кратным количеством буфера PNGаза F Rapid была приобретена у New England Biolabs Inc. (Ипсуич, Массачусетс). Ледяная уксусная кислота (чистота ≥99%), иодацетамид, одноосновный фосфат натрия, двухосновный фосфат натрия, 4-аминобензойная кислота (ПАВА), 4-гидроксibenзойная кислота (НВА), 4-гидроксибензилуксусная кислота (НРАА) и N-(трет-бутоксикарбонил)-тирозин (Boc-Y) были приобретены у Sigma (Сент-Луис, Миссури, США). Трипсин и Asp-N, имеющие чистоту для секвенирования, были приобретены у Promega (Мадисон, Висконсин). Изобарические реагенты тандемные массовые метки (ТМТ), трис(2-карбокsetил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР-НCl), трифторуксусная кислота (ТФА, чистота для секвенирования) и ацетонитрил (Optima, чистота для ЖХ/МС) были приобретены у Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс). 1,0 М трис-НCl UltraPure (pH 7,5) был приобретен у Invitrogen Life Technologies (Карлсбад, Калифорния), а вода высокой чистоты была приобретена у Milli-Q system (Бедфорд, Массачусетс).

Пептидное картирование mAb в восстанавливающих условиях. Пептидное картирование в восстанавливающих условиях выполняли для количественного определения уровней ПТМ (например, циклизации N-концевого Gln/Glu, окисления Met, дезамидирования Asn, циклизации/изомеризации Asp, клиппирования C-концевого Lys, гликирования Lys и гликозилирования Fc) для образцов для определения стабильности mAb-A и образцов для определения сопоставимости mAb-B. 500 мкг каждого образца подвергали замене буфера на 5 мМ уксусной кислоты для удаления ТМТ-реактивных соединений (например, гистидина, трис-НCl), а затем денатурировали и восстанавливали в 5 мМ уксусной кислоте в присутствии 5 мМ ТСЕР-НCl при 80°C в течение 10 мин. После денатурации и восстановления каждый образец разводили 100 мМ PBS (pH 8,0), содержащим 8 М мочевины, и алкилировали иодацетамидом в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. После алкилирования каждый образец дополнительно разводили 50 мМ PBS (pH 8,0) для снижения концентрации мочевины до уровня менее 1 М. Для расщепления трипсином каждый разведенный образец инкубировали с трипсином при отношении фермента к субстрату 1:20 (мас./мас.) при 37°C в течение 4 ч. Для расщепления Asp-N каждый разведенный образец инкубировали с Asp-N при отношении фермента к субстрату 1:50 (мас./мас.) при 37°C в течение 4 ч. Чтобы получить дегликозилированный образец для количественного определения гликозилирования, алиquotу каждого образца, расщепленного трипсином, дополнительно инкубировали с PNGазой F (1 мЕд/мкг белка) в течение еще 1 ч при 37°C для удаления N-связанных гликанов на уровне пептидов. После расщепления трипсином, Asp-N или PNGазой F каждый расщепленный образец делили на две равные алиquotы. Одну алиquotу гасили добавлением 10% ТФА, чтобы остановить расщепление трипсином, и подвергали онлайн-анализу методом ЖХ-МС, а другую алиquotу оставляли для последующей процедуры мечения ТМТ.

Триптическое пептидное картирование невосстановленных mAb. Пептидное картирование в невосстанавливающих условиях выполняли для количественного определения уровней трисульфидных связей для трисульфидных стандартов mAb-C, mAb-D и mAb-E. 500 мкг каждого образца подвергали замене буфера на 100 мМ PBS (pH 7,5) для удаления ТМТ-реактивных соединений (например, гистидина, трис-НCl), а затем денатурировали в 8 М мочевины, содержащей 1,0 мМ иодацетамида в 100 мМ PBS, pH 7,5 при 50°C в течение 10 мин в темноте. После денатурации добавляли 100 мМ PBS (pH 7,5) для разбавления концентрации мочевины в 5 раз. Каждый образец затем расщепляли трипсином при соотношении фермента к субстрату 1:20 (мас./мас.) при 37°C в течение 4 ч. После расщепления трипсином каждый расщепленный образец делили на две равные алиquotы. Одну алиquotу гасили добавлением 10% ТФА, чтобы остановить расщепление трипсином, и подвергали онлайн-анализу методом ЖХ-МС, а другую алиquotу оставляли для последующей процедуры мечения ТМТ.

Мечение ТМТ восстановленных и невосстановленных гидролизатов mAb. Реагенты ТМТ6-plex растворяли в 41 мкл ацетонитрила в соответствии с протоколом производителя (Thermo Scientific).

Аликвоту каждого расщепленного образца (100 мкг) в экспериментах по пептидному картированию в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях инкубировали с 41 мкл метки TMT, растворенной в ацетонитриле, в присутствии контролирующего избыточное мечение реагента (РАВА, НВА, НРАА или Вос-У) (100 моль реагента/моль белка) в течение 1 ч при температуре окружающей среды для мечения. Реакцию мечения останавливали добавлением 10% TFA. Меченые TMT гидролизаты образцов для оценки стабильности mAb-A, образцов для оценки сопоставимости mAb-B и трисульфидных стандартов mAb-E объединяли в равных количествах, соответственно, а затем подвергали анализу методом ЖХ-МС/МС.

Анализ ЖХ-МС/МС. Для нецелевого анализа методом ЖХ-МС/МС аликвоту (приблизительно 8 мкг) каждого гидролизата вводили в колонку ACQUITY UPLC peptide VEN C18 (Waters, 2,1×150 мм, размер частиц 1,7 мкм, размер пор 130 Å). Пептиды элюировали линейным градиентом, который увеличивался от 0,1% подвижной фазы В до 35% подвижной фазы В в течение 75 мин (подвижная фаза А: 0,05% TFA в воде; подвижная фаза В: 0,045% TFA в ацетонитриле) при скорости потока 0,25 мл/мин при температуре колонки 40°C. Затем элюент подвергали электрораспылению и анализировали с использованием гибридного масс-спектрометра Q-Exactive Plus с высокоэнергетической диссоциацией столкновением (HCD), используемого для фрагментации пептидов в экспериментах МС/МС. Прибор работал в режиме положительных ионов и был настроен на следующие параметры сбора данных: разрешение МС1=70000; цель AGC (автоматической регулировки усиления) МС1=1×10<sup>6</sup>; максимальное время ввода МС1=50 мс; диапазон сканирования МС1=400-2000 m/z; разрешение МС2=17500; цель AGC МС2=1×10<sup>5</sup>; максимальное время ввода=100 мс; TopN=5; окно изоляции=4,0 m/z; нормированная энергия столкновения=27; коэффициент незаполнения=10%; совпадение пептидов=предпочтительно; исключить изотопы=вкл.; динамическое исключение=10 с.

Для анализа методом целевой ЖХ-МС/МС аликвоту каждого образца, меченого TMT (приблизительно 8 мкг), разделяли на колонке ACQUITY UPLC peptide VEN C18 (Waters, 2,1×150 мм, размер частиц 1,7 мкм, размер пор 130 Å) с более длинным линейным градиентом, который увеличивался от 0,1% подвижной фазы В до 40% подвижной фазы В в течение 150 мин (подвижная фаза А: 0,05% TFA в воде; подвижная фаза В: 0,045% TFA в ацетонитриле) при скорости потока 0,25 мл/мин при температуре колонки 40°C. Затем элюент подвергали электрораспылению и анализировали с использованием гибридного масс-спектрометра Q-Exactive Plus с HCD, используемого для фрагментации пептидов в экспериментах МС/МС. Целевой список, содержащий триггерное m/z, z, целевое окно времени удерживания и энергию столкновения меченых TMT нативных и модифицированных пептидов, загружали в список включения, чтобы управлять анализом МС/МС предшественников, обнаруженных в обзорных сканированиях МС1. Прибор работал в режиме положительных ионов и был настроен на следующие параметры сбора данных: разрешение МС1=17500; цель AGC МС1=1×10<sup>6</sup>; максимальное время ввода МС1=50 мс; диапазон сканирования МС1=400-2000 m/z; разрешение МС2=17500; цель AGC МС2=1×10<sup>5</sup>; максимальное время ввода=100 мс; фиксированная первая масса=100; окно изоляции=2,0 m/z; нормированная энергия столкновения=27-100.

Анализ данных. Определение пептидов и идентификацию ПТМ осуществляли с использованием Byonic (Protein Metrics Inc., Сан-Карлос, Калифорния; см. источник Bern et al., *Curr. Protoc. Bioinformatics.*, 2012, 40, 13.30.1-12.20.14) и проверяли вручную. В безметочном подходе для относительного количественного определения сайт-специфических ПТМ были созданы хроматограммы выбранного иона в спектрах МС1 на основе m/z первого изотопного пика как нативного пептида, так и модифицированного пептида, и площади выбранных пиков были интегрированы с использованием skyline-daily (MacCoss Lab, Вашингтонский университет, Вашингтон; см. источник MacLean et al., *Bioinformatics.*, 2010, 26, 966-968).

Процент каждой ПТМ рассчитывали с использованием площади пика на хроматограмме выбранного иона (EIC) модифицированного пептида относительно суммы площадей пиков модифицированного и нативного пептидов. В подходе на основе целевой МС/МС для относительного количественного определения сайт-специфических ПТМ были созданы хроматограммы выбранного иона в спектрах МС/МС на основе m/z репортерного иона как нативного пептида, так и модифицированного пептида, и площади выбранных пиков были интегрированы с использованием skyline-daily (MacCoss Lab, Вашингтонский университет, Вашингтон). Процент каждой ПТМ рассчитывали с использованием площади пика EIC репортерного иона из модифицированного пептида относительно суммы площадей пиков репортерного иона из модифицированного и нативного пептидов.

Пример 2. Оптимизация энергии столкновения HCD для количественного определения ПТМ.

Пептиды TMT мечены изобарическими метками, реагирующими с аминами, которые генерируют количественную информацию при активации столкновением. Репортерные ионы TMT образуются в результате расщепления амидной связи за счет энергии столкновения с образованием кластера ионов между 126 и 131 m/z в области малой массы tandemных масс-спектров (Thompson et al., *Anal. Chem.*, 2003, 75, 1895-1904). В основанном на TMT подходе для количественного определения ПТМ репортерный ион, генерированный в спектрах целевой МС/МС нативного пептида и модифицированного пептида, используется для расчета процентного содержания ПТМ. Содержание репортерного иона TMT,

генерированного в спектрах МС/МС, коррелирует с нормированной энергией столкновения (NCE) в ячейке HCD, применяемой к меченому TMT пептиду. Влияние NCE (35-70) на содержание репортерного иона меченых TMT пептидов в mAb-A исследовали, как показано на фиг. 1А. Интенсивности репортерного иона были максимальными, когда NCE увеличивалась до 50 или 55, а затем уменьшались при дальнейшем увеличении NCE до 70. Тем не менее NCE, равная 35, имеет тенденцию давать обширную информацию о фрагментации для идентификации пептидов, а более высокая NCE дает меньше информации о фрагментации по мере увеличения NCE. Например, когда NCE была увеличена до 70, в спектрах МС/МС сохранялось лишь небольшое количество информации о фрагментации.

Количественное определение различных типов ПТМ в mAb-A с использованием репортерного иона, генерированного в спектрах целевой МС/МС нативных и модифицированных пептидов при различных NCE, исследовали в отношении окисления Met, дезамидирования Asn, циклизации/изомеризации Asp, клиппирования С-концевого Lys и гликозилирования Fc, и сравнивали с количественным определением ПТМ с использованием традиционного подхода, основанного на MS1. Отмечено, что не наблюдается существенной разницы в процентах различных ПТМ при NCE 35-70, и проценты ПТМ были сопоставимы с процентами, определенными с использованием традиционного подхода, когда первый изотопный пик нативного и модифицированного пептидов-предшественников в обзорных сканированиях MS1 использовались для расчета процента (см. фиг. 1В), что демонстрирует осуществимость подхода на основе целевой МС/МС для количественного определения ПТМ. Результаты также показывают, что изменяющаяся тенденция содержания репортерного иона при разных NCE одинакова для нативных и модифицированных пептидов. Чтобы максимизировать чувствительность количественного определения редко встречающихся ПТМ при сохранении удовлетворительной информации о фрагментации для подтверждения последовательности пептида была выбрана NCE 55 для количественного определения окисления Met, дезамидирования Asn, циклизации/изомеризации Asp, клиппирования С-концевого Lys и гликозилирования Fc.

Циклизация N-концевого Gln или Glu в легкой или тяжелой цепи с образованием пироглутамата (PyroE или PyroQ) является основным типом N-концевой модификации (Liu et al., mAbs, 2014, 6, 1145-1154). Однако эта модификация ингибирует реакцию реагента для мечения TMT с N-концевой аминокислотой путем блокирования N-конца пептида, что ограничивает возможности этого подхода мультиплексирования для количественного определения этой модификации. Чтобы преодолеть это ограничение, исследовали N-концевые пептиды из mAb-A, содержащие Gln или Glu на N-конце, а также остаток лизина на С-конце. В нативном пептиде как N-концевая аминокислота, так и ε-аминогруппа боковой цепи лизина может быть мечена метками TMT, однако в модифицированном пептиде может быть мечена только ε-аминогруппа боковой цепи лизина из-за заблокированной N-концевой аминокислоты. Чтобы оценить возможность использования репортерного иона, генерированного из нативных и модифицированных пептидов, для этого количественного определения ПТМ, рассчитывали процентное содержание пироглутамата при различных NCE (27-100) и сравнивали со значением, полученным при традиционном подходе. Как показано на фиг. 2В, этот подход обеспечил наиболее сопоставимый результат при NCE 35 по сравнению с традиционным подходом (NCE 35 также для PyroQ). Сниженный процент наблюдался при более высокой и более низкой NCE, а при NCE 27 и NCE 55 процентное содержание пироглутамата составляло лишь ~50% от значения, полученного при традиционном подходе. Поэтому для количественного определения пироглутамата была выбрана NCE 35.

Также было исследовано количественное определение гликирования Lys в mAb-B и mAb-C (с разными уровнями) с использованием репортерного иона. Гликирование - это ферментативный процесс, который может привести к модификации первичных аминов путем восстановления сахаров (например, глюкозы, фруктозы). Остатки лизина особенно восприимчивы к гликированию в белке с увеличением массы боковой цепи на 162,05 Да и создают гетерогенность заряда за счет изменения боковой цепи первичного амина с основной на нейтральную (Liu et al., mAbs, 2014, 6, 1145-1154).

Поскольку гликирование Lys ингибирует расщепление пептидной связи трипсином в гликированных сайтах Lys, в результате получается пептид с гликированными остатками Lys, имеющими другую длину по сравнению с пептидом, имеющим нативные остатки Lys. Поэтому для анализа продуктов гликирования в сайте Lys было проведено пептидное картирование с расщеплением Asp-N. Подобно пироглутамату N-концевого Gln/Glu, гликирование может изменять физические свойства остатка лизина, делая остаток лизина неактивным по отношению к реагенту TMT и, следовательно, приводя к разному количеству меток TMT на нативном пептиде и гликированном пептиде. Исследование влияния различных NCE (35-100) на количественное определение этой ПТМ показало, что разные проценты также были получены при разных NCE, причем более высокая NCE давала более высокий процент гликирования. Процент, сопоставимый с количественным определением при традиционном подходе, может быть достигнут при увеличении NCE до 90-100 (фиг. 2). Наблюдаемая сильная зависимость от NCE для количественного определения ПТМ пироглутамата и гликирования может быть связана с непоследовательными тенденциями изменения содержания репортерного иона с разными NCE между нативным пептидом и модифицированным пептидом. Например, содержание репортерного иона было максимальным при различных NCE 55 и 70 для

нативного пептида и гликозилированного пептида соответственно. Таким образом, для достижения сопоставимого с традиционным подходом количественного определения была выбрана NCE 90 для количественного определения гликирования Lys. Следует отметить, что из-за отсутствия достаточной информации о фрагментации можно использовать предварительный анализ с более низким значением NCE (например, 35) для подтверждения последовательности пептида и модификации лизина.

Трисульфид также является распространенной модификацией, которая была обнаружена во всех подклассах рекомбинантных IgG. Трисульфидные связи часто присутствуют между пептидами легкой и тяжелой цепей в моноклональных антителах (Gu et al., 2010, 400, 89-98). Эта трисульфидная модификация происходит путем включения атома серы в дисульфидную связь между тяжелой и легкой цепями ( $\text{Cys-S-S-Cys} + \text{H}_2\text{S} + [\text{O}] \rightarrow \text{Cys-S-S-S-Cys} + \text{H}_2\text{O}$ ), что приводит к увеличению массы на 31,97 Да. Сообщалось, что присутствие трисульфидных связей не влияет на термическую стабильность, а также на связывание антигена и эффективность. Тем не менее уровни трисульфидных связей могут варьироваться от партии к партии и от процесса к процессу, вероятно, из-за изменений уровней следового  $\text{H}_2\text{S}$  в производственных биореакторах, поэтому уровни трисульфидных связей обычно контролируют в образцах моноклональных антител во время разработки процесса культивирования клеток. Для разработки мультиметрического метода количественного определения трисульфидных связей были исследованы количественные результаты при различных NCE для моноклональных антител mAb-C (IgG1) и mAb-D (IgG4) соответственно. Интересно, что процентное содержание трисульфидных связей продемонстрировало четкую линейную зависимость от NCE как для mAb-C, так и для mAb-D, как показано на фиг. 3А и 3В. Когда NCE была увеличена до 55, % трисульфидных связей, определенный с использованием этого подхода, был сопоставим с традиционным подходом как для антител IgG1, так и для антител IgG4, и поэтому она была выбрана в качестве оптимизированной NCE для количественного определения трисульфидных связей.

Пример 3. Низкомолекулярные добавки для предотвращения избыточного мечения реагентом TMT.

Сообщалось, что помимо N-концевой аминогруппы и  $\epsilon$ -аминогруппы боковой цепи лизина мечение TMT боковой цепи лизина также может происходить по тирозину (Tyr), треонину (Thr) и серину (Ser) в результате нецелевой реакции с гидроксильной группой в этих аминокислотах (Zecha et al., Mol. Cell. Proteomics., 2019, 18, 1468-1478). Это избыточное мечение TMT может снизить чувствительность количественного определения ПТМ в этом подходе за счет разделения ответов нативного пептида и модифицированного пептида на множество фрагментов, меченых разными количествами метки TMT. Например, авторы изобретения наблюдали это при количественном определении ПТМ из триптического пептида (SEQ ID NO: 3, WQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQK), расположенного в консервативном домене CH3 тяжелой цепи IgG, содержащего остаток метионина, подверженный окислению. После мечения TMT наблюдалась смесь фрагментов с разными метками TMT (до 6), а также наблюдалось множество изоформ для соединений, содержащих 3, 4 и 5 меток TMT. В таблице, представленной на фиг. 9, обобщено относительное содержание фрагментов пептида WQQG (остатки 1-4 SEQ ID NO: 3) с разными метками TMT и с разными изоформами. Высокогетерогенное мечение TMT этого пептида распределяет общее содержание в целых 15 различных форм с относительным содержанием в диапазоне от 0,2 до 22,0%, что создает серьезную проблему для количественного определения окисления Met в этом пептиде, особенно когда уровень является низким, с использованием подхода, основанного на целевой MS/MS.

Чтобы ингибировать избыточное мечение TMT, первоначально исследовали различные отношения TMT к белку (мас./мас.) в диапазоне от 8:1 до 1:1. Уменьшение количества реагента TMT может свести к минимуму избыточное мечение, однако может также увеличить недостаточное мечение пептида. Например, эффективность мечения целевых пептидов может быть снижена с более чем 90 до ~35% при изменении отношения от 8:1 до 1:1. В качестве альтернативы оценивали различные гидроксилсодержащие небольшие молекулы (РАВА, НВА, НРАА и Вос-Y), введенные в гидролизаты во время мечения TMT, в качестве конкурирующих реагентов для этих нецелевых аминокислотных остатков, которые реагируют с избыточным количеством реагента TMT и препятствуют избыточному мечению. Как показано на фиг. 9, добавление этих небольших молекул действительно в определенной степени ингибировало избыточное мечение пептидов TMT. Для пептида WQQG (остатки 1-4 SEQ ID NO: 3), хотя фрагменты, содержащие 3 метки TMT, по-прежнему являются избыточно меченым продуктом, множество изоформ пептида, меченого 3 TMT, сводились в единую доминирующую форму, составляющую более 50% общего содержания всех фрагментов, относящихся к этому пептиду. Образование фрагментов, содержащих 5 и 6 меток TMT, было значительно подавлено; вместо них имело место увеличение мечения 2 и 3 TMT. Подобный ингибирующий эффект можно наблюдать и для другого пептида TTPP: добавление небольших молекул подавляло образование продукта, меченого 3 TMT, с 26 до <7%, и увеличивало ожидаемый продукт, меченый 2 TMT, до ~94%. Хотя все четыре небольшие молекулы продемонстрировали способность ингибировать избыточное мечение TMT, РАВА была выбрана в качестве наиболее подходящего конкурирующего реагента, учитывая ее более высокую гидрофильность и более низкую молекулярную массу по сравнению с другими малыми молекулами, которая с меньшей вероятностью будет мешать пептидам-мишеням и вводить фоновый сигнал масс-

спектрометрии.

Пример 4. Воспроизводимость и чувствительность мультиплексного количественного определения ПТМ с использованием ТМТ.

Чтобы оценить воспроизводимость и чувствительность этого подхода, основанного на целевой МС/МС, для количественного определения ПТМ, из каждого триптического гидролизата образца mAb-A из трех препаратов (три определения) брали аликвоты по шесть порций с известным соотношением 1:1:1:1:1:1 и 1:2:4:8:16:32, а затем метили 6-плексными метками ТМТ. Три объединенных образца каждом соотношении анализировали дважды (два параллельных анализа) с использованием ЖХ-МС/МС. Четыре репрезентативных ПТМ (гликозилирование Lys, дезамидирование Asn, циклизация/изомеризация Asp и окисление Met) с уровнями в диапазоне от 0,6 до 3,3% (проценты рассчитаны на основе традиционного подхода) были выбраны для оценки воспроизводимости количественного определения и чувствительности этого подхода. Интегрированные площади пиков хроматограмм выбранного репортерного иона нативных и модифицированных пептидов использовали для расчета процентного содержания четырех ПТМ в каждом канале ТМТ. На фиг. 4А показана оценка относительного количественного определения четырех ПТМ в mAb-E в шести каналах ТМТ при соотношении 1:1:1:1:1:1. На фиг. 4В показана оценка воспроизводимости относительного количественного определения четырех ПТМ в mAb-E в шести каналах ТМТ при соотношении 1:1:1:1:1:1.

На фиг. 5 показаны средние проценты и RSD четырех ПТМ, определенных количественно в шести каналах ТМТ при соотношении 1:2:4: 8:16:32, что соответствует количествам загружаемого образца 0,15, 0,30, 0,60, 1,2, 2,4 и 4,8 мкг соответственно. Средние проценты и относительные среднеквадратические отклонения (RSD) четырех ПТМ, определенных количественно при различных загружаемых количествах, варьировались от 0,6-0,9 до 3,3-29,0% для гликозилирования Lys, от 1,6-1,9 до 3,6-7,2% для дезамидирования Asn, от 2,4-2,6 до 3,4-7,3% для циклизации/изомеризации Asp и от 3,3-3,5 до 3,6-9,4% для окисления Met. В целом средние процентные содержания этих ПТМ, определенные количественно при различных загружаемых количествах, были сопоставимы с процентными содержаниями, рассчитанными с использованием традиционного подхода (загружаемое количество приблизительно 5,0 мкг), даже для редко встречающихся ПТМ, таких как гликозилирование Lys (приблизительно 0,6%), исследованных в этом исследовании. Хотя, когда загружаемое количество составляло 0,15 мкг, наблюдалось большое отклонение с RSD 29,0% (>15%) для количественного определения этого низкого уровня гликирования Lys, что могло быть связано с очень низким содержанием репортерного иона, генерированного из модифицированного пептида при NCE 90; все RSD количественного определения ПТМ с более высокими уровнями или более высокими загружаемыми количествами были в пределах 15%, что демонстрирует высокую чувствительность этого подхода для мультиплексного количественного определения ПТМ при таких низких уровнях, как 1,0%, когда количество загружаемого образца составляет всего приблизительно 0,15 мкг.

Пример 5. Мультиплексное количественное определение ПТМ с использованием ТМТ для образцов для оценки стабильности mAb-A.

Образцы для оценки стабильности mAb-A анализировали с использованием этого подхода, основанного на целевой МС/МС. В общей сложности четыре образца, включая контрольный образец, расщепляли трипсином в восстанавливающих условиях, а затем метили реагентами 4-plex ТМТ (каналы 126, 127, 128, 129, 130 и 131). Объединенный образец анализировали с использованием ЖХ-МС/МС для количественного определения ПТМ. Отдельные расщепленные образцы, не меченые ТМТ, также анализировали с использованием традиционного подхода для количественного определения ПТМ. На фиг. 6 обобщены количественные результаты мультиплексного определения ПТМ для шести образцов с использованием этого подхода, а также результаты количественного определения с использованием традиционного подхода для сравнения. При обоих подходах наблюдались сопоставимые результаты количественного определения ПТМ. Наблюдалось влияние температуры на уровни окисления при Met258 и Met434, дезамидирования при Asn390 и циклизации/изомеризации при Asp286, причем образцы, инкубированные при 45 и 25°C, демонстрировали более высокие уровни, чем контрольный образец и образец, инкубированный при 5°C. Кроме того, образец, инкубированный при 45°C в течение 28 дней, демонстрировал несколько более высокие уровни этих ПТМ, чем образец, инкубированный при 25°C в течение 6 месяцев. Не было выявлено существенной разницы в уровнях при сравнении контрольного образца с образцом, инкубированным при 5°C в течение 24 месяцев. Для окисления, дезамидирования и циклизации/изомеризации в других сайтах их уровни были сопоставимы во всех четырех образцах, независимо от условий воздействия, испытанных в этом исследовании. Это исследование конкретного случая демонстрирует возможности данного подхода для количественного определения разницы уровней ПТМ в образцах антител.

Пример 6. Мультиплексное количественное определение ПТМ с использованием ТМТ для образцов для оценки сопоставимости mAb-B.

Этот пример иллюстрирует количественную оценку уровней ПТМ в образцах для оценки сопоставимости mAb-F для демонстрации сопоставимого качества моноклональных антител, произведенных на разных технологических площадках. В общей сложности четыре образца для оценки

сопоставимости расщепляли трипсином в восстанавливающих условиях, а затем метили реагентами 4-plex TMT (каналы 128, 129, 130 и 131). Объединенный образец анализировали с использованием ЖХ-МС/МС для количественного определения ПТМ. Отдельные расщепленные образцы, не меченые TMT, также анализировали с использованием традиционного подхода для количественного определения ПТМ. Количественные результаты ПТМ для четырех образцов для оценки сопоставимости, полученные с использованием обоих подходов, обобщенно представлены на фиг. 7А и 7В. Использовали два подхода для количественного определения сопоставимости процентных содержаний ПТМ, и все ПТМ, включая окисление Met, дезамидирование Asn, циклизацию и изомеризацию Asp и C-концевой лизин, продемонстрировали сопоставимые уровни в четырех образцах mAb-B, произведенных на разных технологических площадках. На фиг. 7А показаны ПТМ с уровнями >2,5%, а на фиг. 7В показаны ПТМ с уровнями ≤2,5%.

Пример 7. Мультиплексное количественное определение ПТМ с использованием TMT для стандартных образцов для оценки трисульфидных связей mAb-E.

Были получены стандартные образцы для оценки трисульфидных связей для построения калибровочной кривой для мониторинга уровней трисульфидных связей в образцах, взятых в ходе технологического процесса, во время разработки процесса культивирования клеток. В этом примере авторы применили подход, основанный на целевой МС/МС, для количественного определения уровней трисульфидных связей в пяти стандартных образцах для оценки трисульфидных связей mAb-E, полученных путем смешивания образца, подвергнутого воздействию H<sub>2</sub>S, с эталонным стандартным образцом в различных соотношениях 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 и 0:100 соответственно. Пять стандартных образцов для оценки трисульфидных связей расщепляли трипсином в невосстанавливающих условиях, а затем метили реагентами 5-plex TMT (каналы 126, 127, 128, 129 и 130). Объединенный образец анализировали с использованием ЖХ-МС/МС для количественного определения трисульфидных связей. Отдельные расщепленные образцы, не меченые TMT, также анализировали с использованием традиционного подхода для сравнения. Как показано на фиг. 8, уровни трисульфидных связей в стандартных образцах, определенные с использованием этого подхода, составили 14,9, 11,1, 7,5, 3,2 и 0,1% соответственно. Эти результаты хорошо согласовывались со значениями, рассчитанными на основе соотношений в смеси подвергнутых воздействию и эталонных стандартных образцов, а также были сопоставимы со значениями, полученными при традиционном подходе, с соответствующими уровнями трисульфидных связей, равными 15,2, 11,7, 7,8, 3,2 и 0,1% соответственно.

Раскрытый мультиплексный подход на основе TMT совместим с текущим технологическим процессом пептидного картирования для количественного определения ПТМ с минимальными изменениями в процедуре подготовки образцов, но значительно сокращает время сбора данных в масс-спектрометрии, особенно при анализе большого набора образцов. В настоящем изобретении показано, что, настраивая NCE от 35 до 90, можно количественно определять различные типы ПТМ с использованием репортерного иона, генерированного из нативных и модифицированных пептидов в спектрах целевой МС/МС, с достижением процентных содержаний, сопоставимых с таковыми в традиционном подходе. Показано, что этот подход обеспечивает превосходную воспроизводимость и чувствительность для количественного определения ПТМ с уровнями всего лишь 1,0% даже при небольшом количестве загружаемого образца. Функция мультиплексирования этого подхода расширяет аналитические возможности получения биофармацевтической характеристики белка на основе ЖХ-МС за счет количественного определения качественных показателей множества образцов в одном цикле ЖХ-МС, а также снижает вариабельность от цикла к циклу при количественном определении ПТМ, с которой можно столкнуться при индивидуальном анализе образцов с использованием ЖХ-МС при традиционном подходе, что повышает качество масс-спектрометрических данных для точного и воспроизводимого количественного определения ПТМ. В целом, как продемонстрировано в настоящем изобретении на примере анализа образцов моноклональных антител в исследованиях различных конкретных случаев, разработанный подход обеспечивает более эффективный способ по сравнению с традиционным подходом для лучшего удовлетворения постоянно растущих потребностей в получении характеристики моноклональных антител на разных этапах разработки лекарственных средств.

Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем изобретении. Действительно различные модификации данного изобретения в дополнение к описанным в настоящем изобретении будут очевидны специалистам в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых графических материалов. Понимается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ количественного определения множества показателей качества множества образцов в одном цикле масс-спектрометрии (МС), включающий  
 приведение двух или более образцов в контакт с расщепляющим раствором в условиях, достаточных для расщепления двух или более образцов, где каждый образец расщепляется отдельно и расщеп-

ляющий раствор представляет собой буферный раствор, не содержащий трис-буфера;

приведение каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт с низкомолекулярной добавкой перед приведением каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт со специфическим реагентом для мечения тандемной массовой меткой (ТМТ), где низкомолекулярная добавка выбрана из группы, состоящей из ВОС-У-ОН, п-крезола, гидроксифенилуксусной кислоты (НРАА), гидроксibenзойной кислоты (НВА), ацетаминофена и п-аминобензойной кислоты (РАВА);

приведение каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт со специфическим реагентом для мечения ТМТ в условиях, достаточных для мечения пептидов в каждом из двух или более расщепленных образцов с использованием специфического реагента для мечения ТМТ;

гашение мечения пептидов в каждом из двух или более расщепленных образцов;

объединение равных объемов двух или более меченых расщепленных образцов в раствор одного объединенного образца; и

анализ раствора одного объединенного образца с использованием нацеленного масс-спектрального анализа с обеспечением таким образом возможности количественного определения множества показателей качества двух или более образцов в одном цикле МС.

2. Способ по п.1, где множество показателей качества включают посттрансляционную модификацию (ПТМ).

3. Способ по п.2, где ПТМ включает одно или более из дезамидирования, окисления, гликирования, образования дисульфидных связей, образования N-концевого пироглутамата, удаления C-концевого лизина и гликозилирования.

4. Способ по п.3, где ПТМ включает гликозилирование.

5. Способ по любому из пп.2-4, где количественное определение множества показателей качества в одном цикле МС включает количественное определение ПТМ путем количественного определения относительного содержания ПТМ по площадям выбранных пиков полученного репортерного иона, генерированного в целевых масс-спектрах.

6. Способ по п.1, где низкомолекулярная добавка представляет собой РАВА.

7. Способ по любому из пп.1-6, где пептиды представляют собой гликопептиды.

8. Способ по п.7, где гликопептиды получены из моноклонального антитела.

9. Способ по п.8, где моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

10. Способ по любому из пп.1-9, где два или более образцов представляют собой от 2 до 11 образцов.

11. Способ по любому из пп.1-10, дополнительно включающий получение двух или более образцов для анализа.

12. Способ по любому из пп.1-11, дополнительно включающий подготовку двух или более образцов для расщепления перед приведением двух или более образцов в контакт с расщепляющим раствором в условиях, достаточных для расщепления двух или более образцов.

13. Способ по п.12, где подготовка двух или более образцов перед расщеплением включает приведение каждого из двух или более образцов в контакт с денатурирующим и восстанавливающим раствором в условиях, которые обеспечивают денатурацию и восстановление образца; и

приведение каждого из двух или более денатурированных и восстановленных образцов в контакт с алкилирующим раствором в условиях, которые обеспечивают алкилирование образца.

14. Способ по любому из пп.1-13, где анализ раствора одного объединенного образца с использованием нацеленного масс-спектрального анализа включает нанесение одного объединенного образца на разделительную колонку и проведение направленного масс-спектрального анализа элюированных компонентов образца.

15. Способ по п.14, где разделительная колонка представляет собой колонку для жидкостной хроматографии.

16. Способ по п.14 или 15, где проведение нацеленного масс-спектрального анализа элюированных компонентов образца включает применение ионизации электрораспылением для генерирования заряженных ионов из элюированных компонентов образца и измерение генерированных заряженных ионов.

17. Способ количественного определения посттрансляционных модификаций (ПТМ) множества образцов в одном цикле масс-спектрометрии (МС), включающий

приведение двух или более образцов в контакт с расщепляющим раствором в условиях, достаточных для расщепления двух или более образцов, где каждый образец расщепляется отдельно и расщепляющий раствор представляет собой буферный раствор, не содержащий трис-буфера;

приведение каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт с низкомолекулярной добавкой, где низкомолекулярная добавка выбрана из группы, состоящей из ВОС-У-ОН, п-крезола, гидроксифенилуксусной кислоты (НРАА), гидроксibenзойной кислоты (НВА), ацетаминофена и п-аминобензойной кислоты (РАВА);

приведение каждого из двух или более расщепленных образцов в контакт со специфическим реагентом для мечения тандемной массовой меткой (ТМТ) в условиях, достаточных для мечения пептидов в каждом из двух или более расщепленных образцов с использованием специфического реагента для мече-

ния ТМТ;

гашение мечения пептидов в каждом из двух или более расщепленных образцов;  
объединение равных объемов двух или более меченых расщепленных образцов в раствор одного объединенного образца; и

анализ раствора одного объединенного образца с использованием нацеленного масс-спектрального анализа с обеспечением таким образом возможности количественного определения ПТМ двух или более образцов в одном цикле МС.

18. Способ по п.17, где ПТМ включают одно или более из дезамидирования, окисления, гликирования, образования дисульфидных связей, образования N-концевого пироглутамата, удаления C-концевого лизина и гликозилирования.

19. Способ по п.18, где ПТМ включают гликозилирование.

20. Способ по любому из пп.17-19, где количественное определение ПТМ включает количественное определение относительного содержания ПТМ по площадям выбранных пиков полученного репортерного иона, генерированного в целевых масс-спектрах.

21. Способ по п.17, где низкомолекулярная добавка представляет собой ПАВА.

22. Способ по любому из пп.17-21, где пептиды представляют собой гликопептиды.

23. Способ по п.22, где гликопептиды получены из моноклонального антитела.

24. Способ по п.23, где моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

25. Способ по любому из пп.17-24, где два или более образцов представляют собой от 2 до 16 образцов.

26. Способ по любому из пп.17-25, дополнительно включающий получение двух или более образцов для анализа.

27. Способ по любому из пп.17-26, дополнительно включающий подготовку двух или более образцов для расщепления перед приведением двух или более образцов в контакт с расщепляющим раствором в условиях, достаточных для расщепления двух или более образцов.

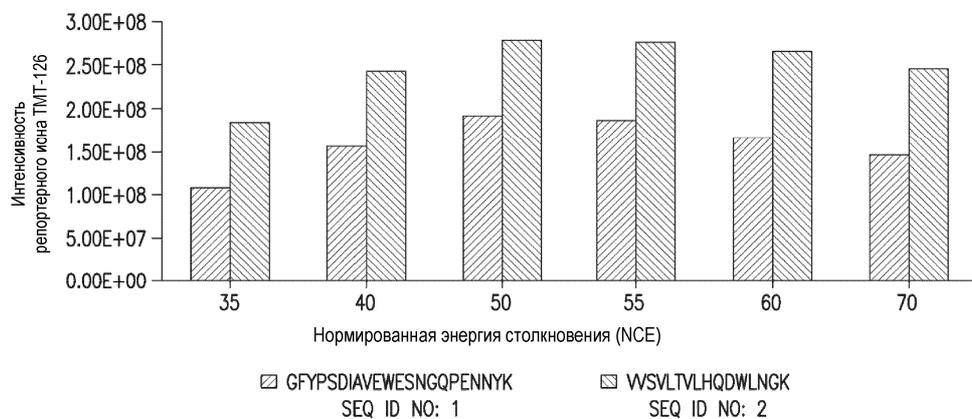
28. Способ по п.27, где подготовка двух или более образцов перед расщеплением включает приведение каждого из двух или более образцов в контакт с денатурирующим и восстанавливающим раствором в условиях, которые обеспечивают денатурацию и восстановление образца; и

приведение каждого из двух или более денатурированных и восстановленных образцов в контакт с алкилирующим раствором в условиях, которые обеспечивают алкилирование образца.

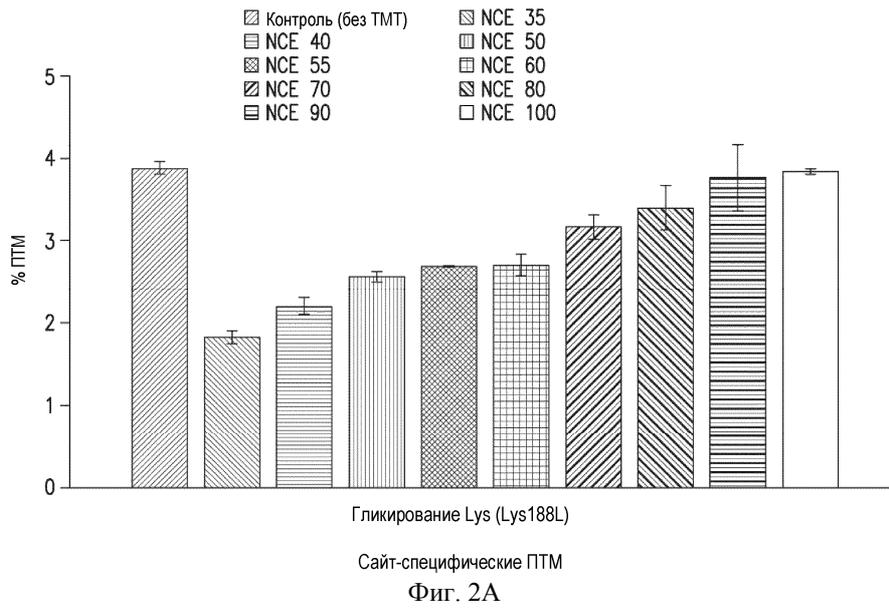
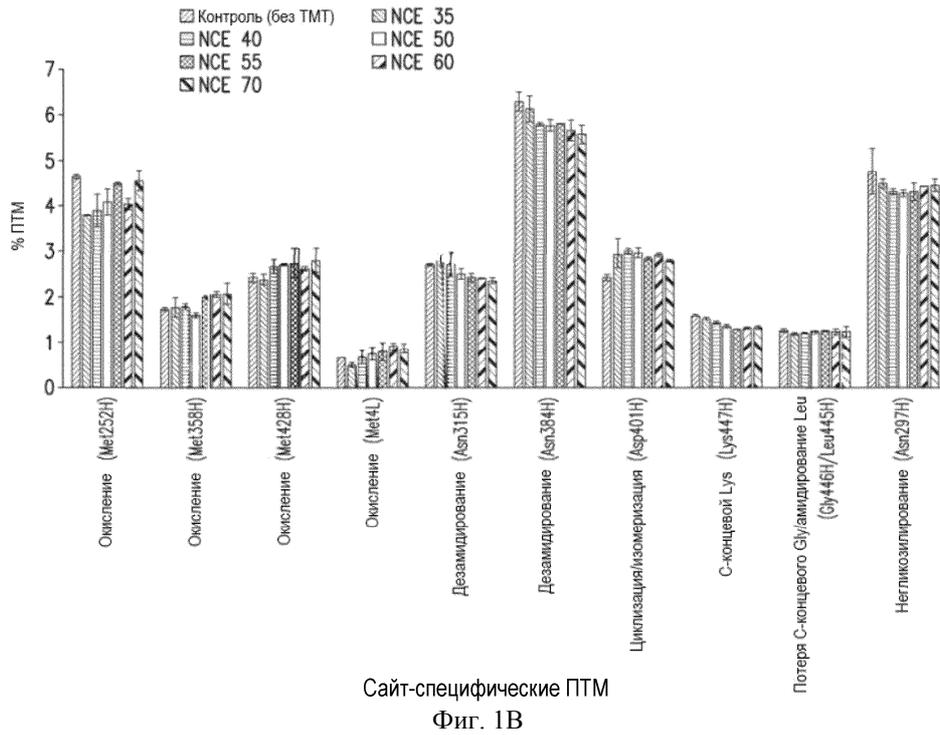
29. Способ по любому из пп.17-28, где анализ раствора одного объединенного образца с использованием нацеленного масс-спектрального анализа включает нанесение одного объединенного образца на разделительную колонку и проведение направленного масс-спектрального анализа элюированных компонентов образца.

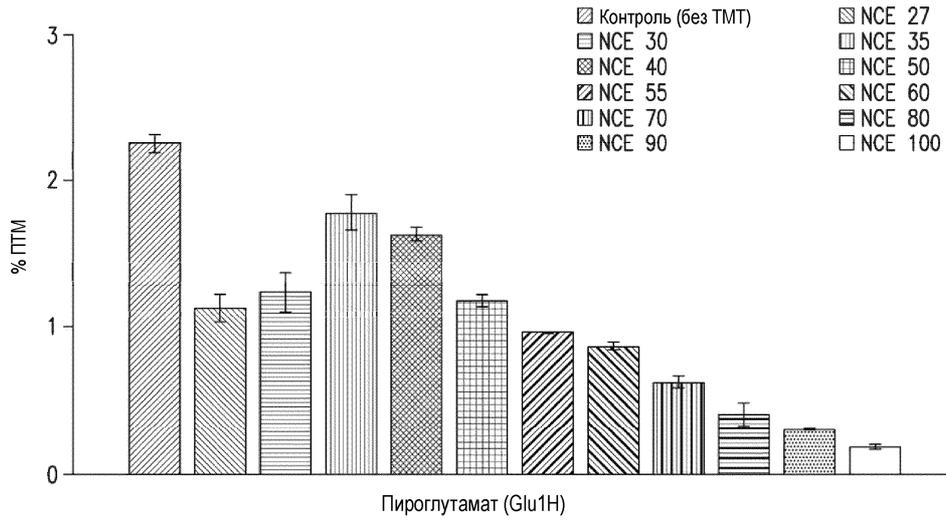
30. Способ по п.29, где разделительная колонка представляет собой колонку для жидкостной хроматографии.

31. Способ по п.29 или 30, где проведение нацеленного масс-спектрального анализа элюированных компонентов образца включает применение ионизации электрораспылением для генерирования заряженных ионов из элюированных компонентов образца и измерение генерированных заряженных ионов.

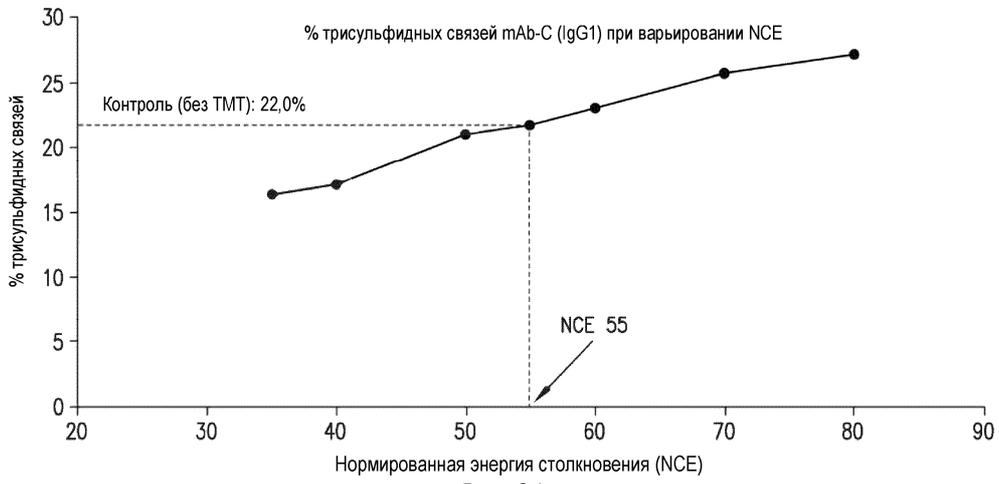


Фиг. 1А

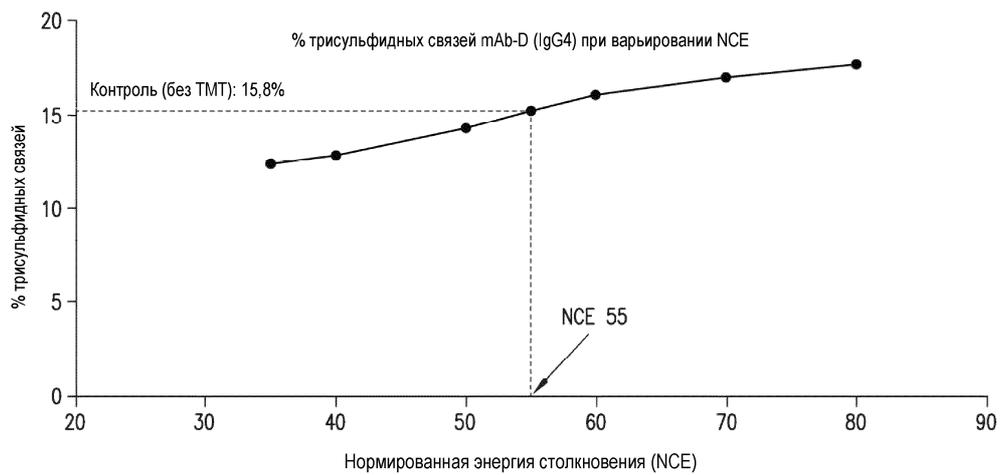




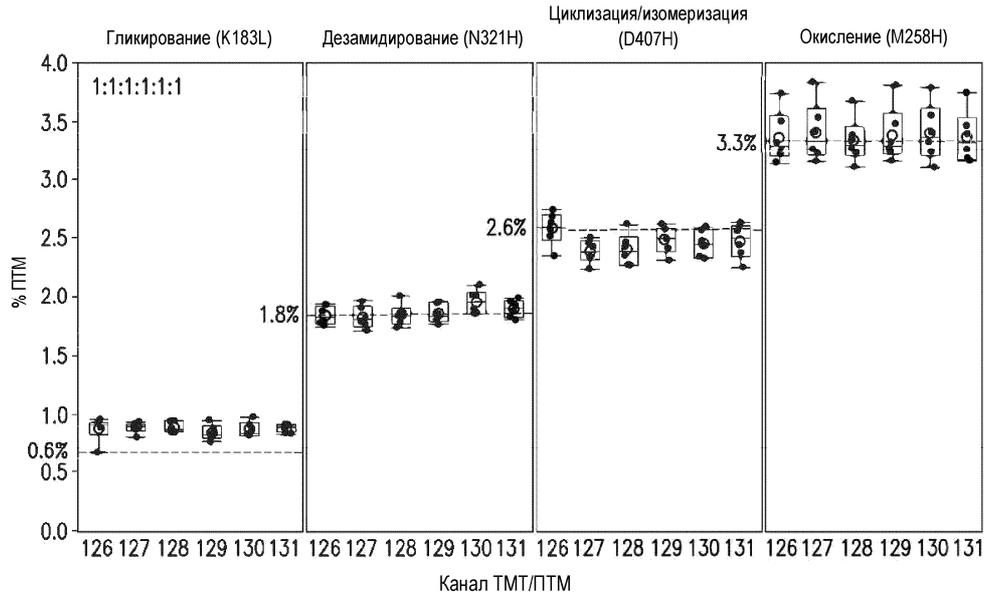
Сайт-специфические ПТМ  
Фиг. 2В



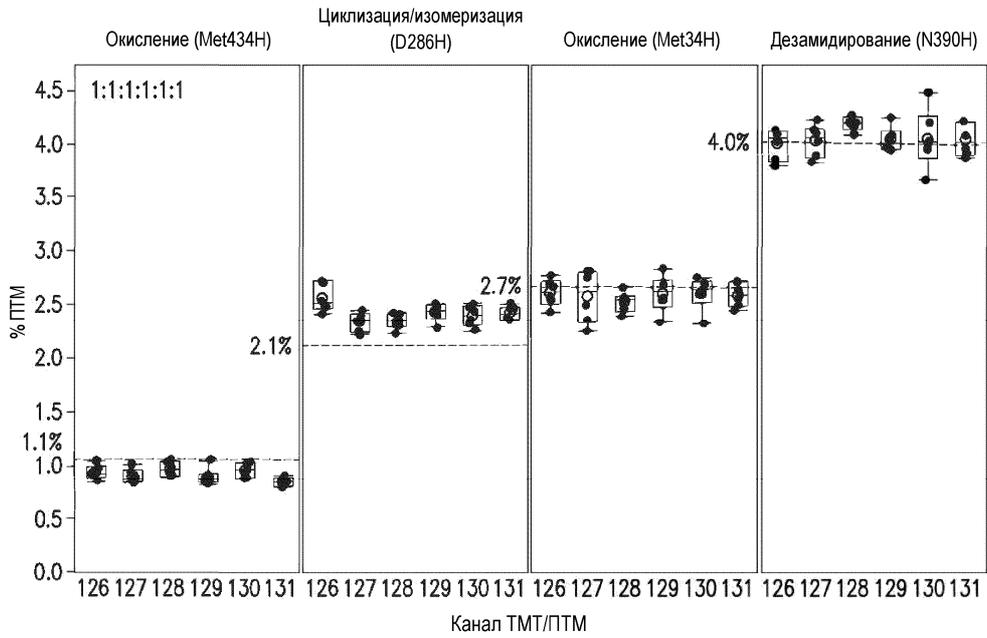
Фиг. 3А



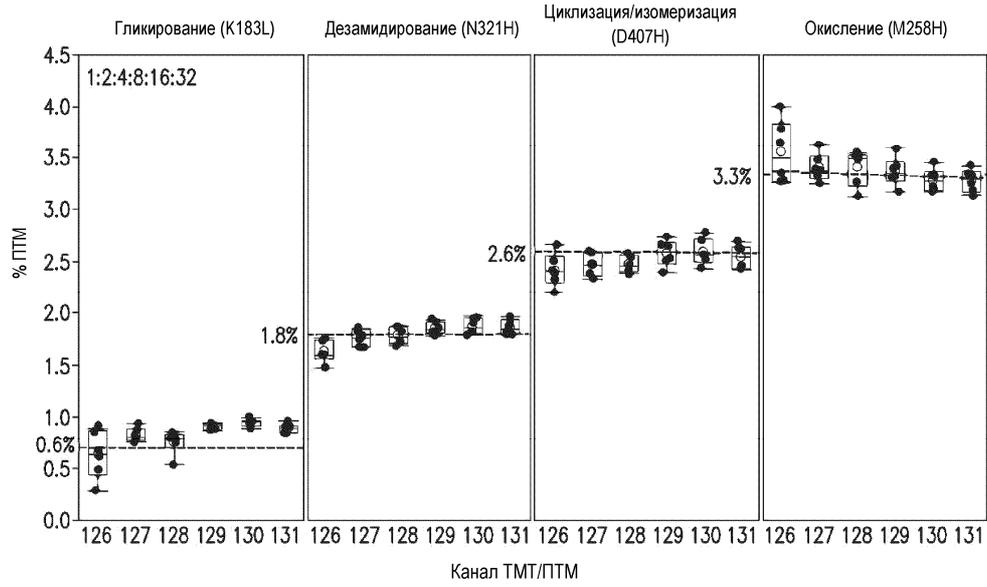
Фиг. 3В



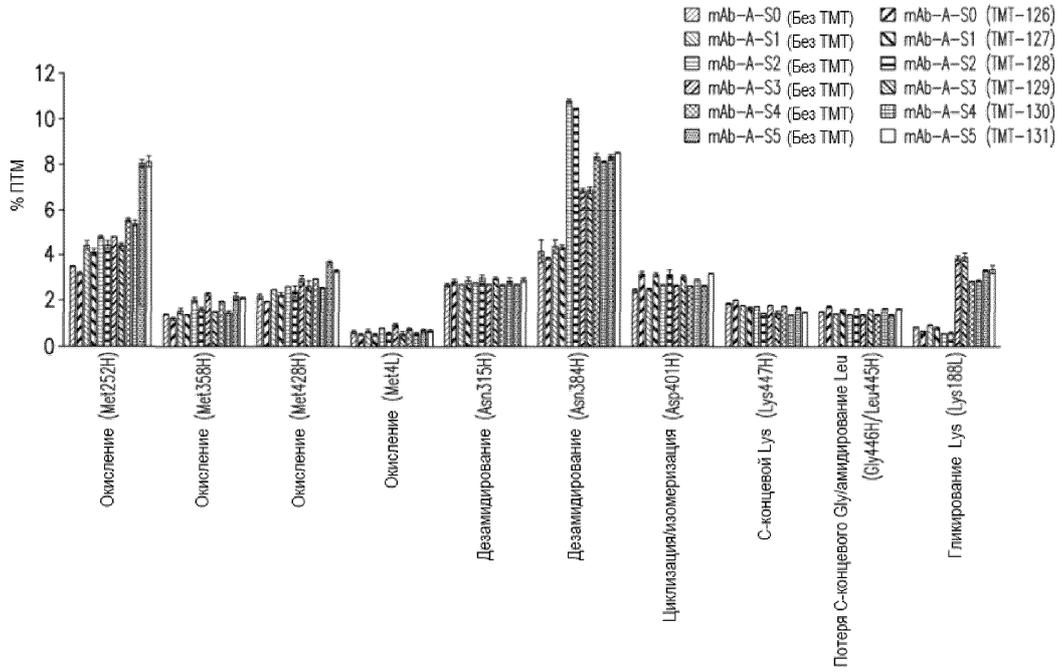
Фиг. 4А



Фиг. 4В

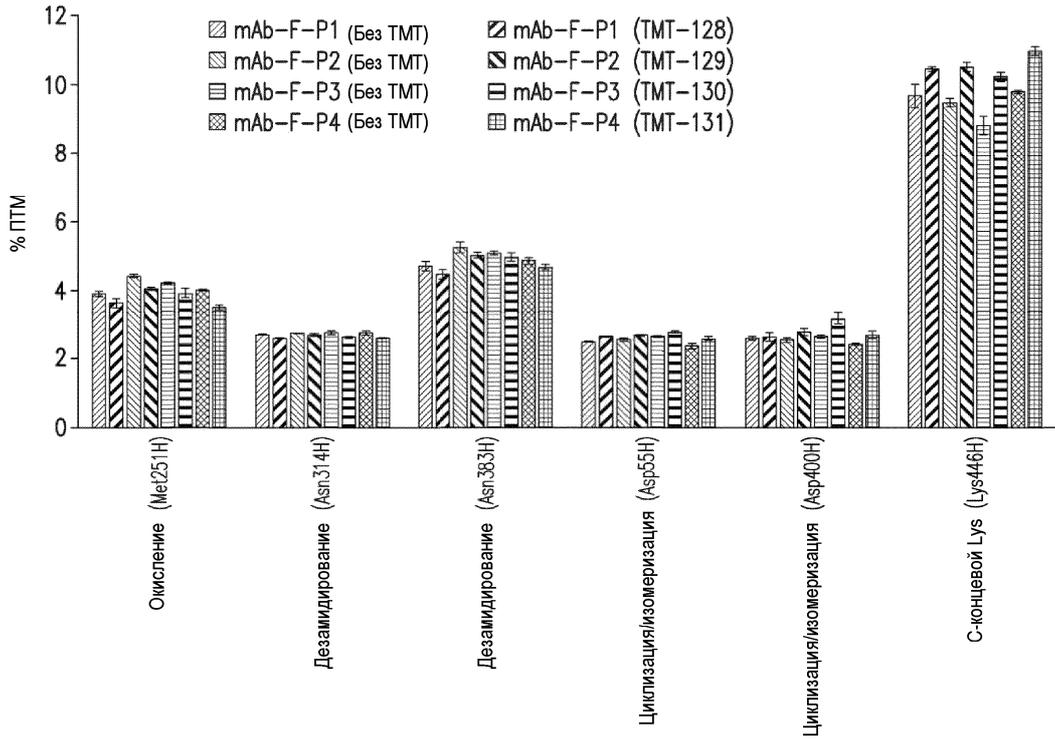


Фиг. 5



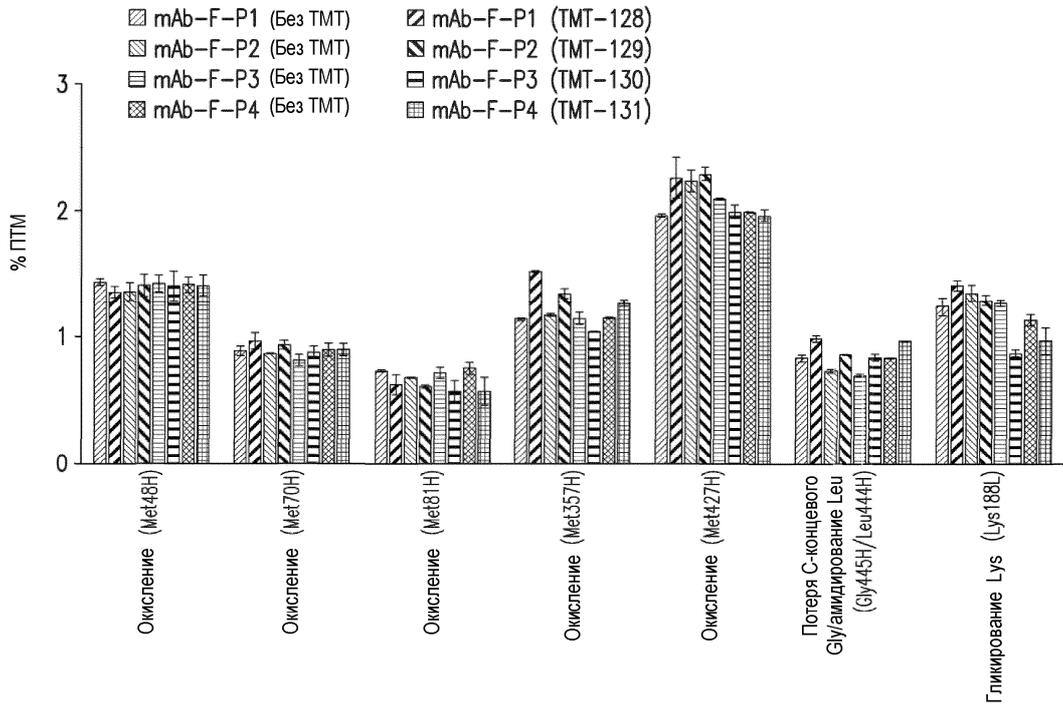
Сайт-специфические ПТМ

Фиг. 6



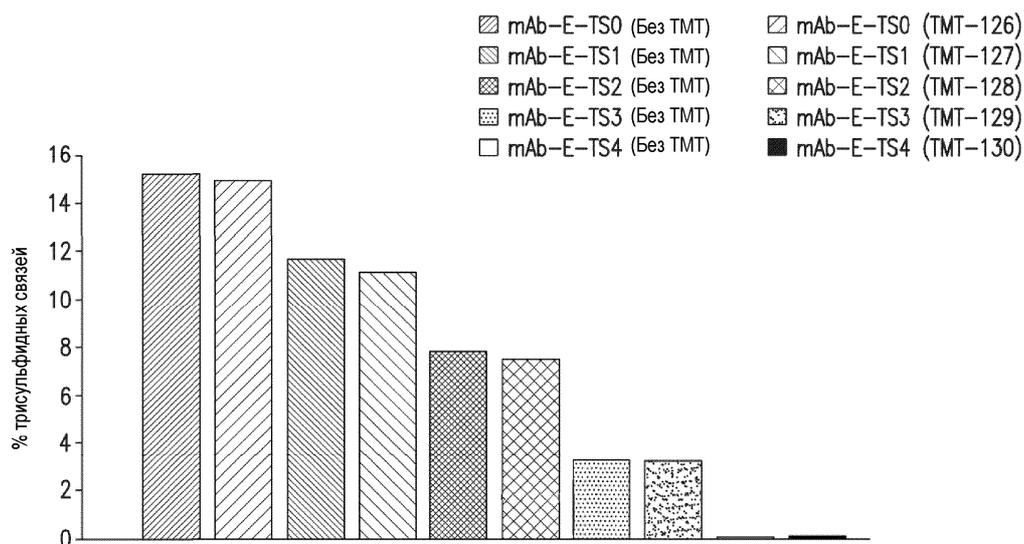
Сайт-специфические ПТМ

Фиг. 7А



Сайт-специфические ПТМ

Фиг. 7В

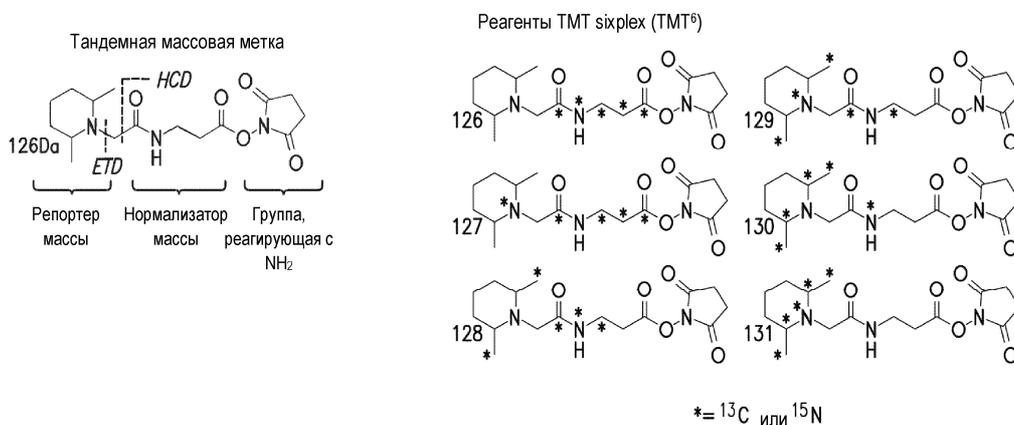


Стандартные образцы для оценки трисульфидных связей

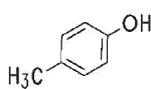
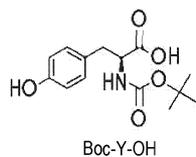
Фиг. 8

Пептид	Кол-во TMT	Меченые TMT фрагменты	Процент меченых TMT фрагментов (%)					
			Контроль (без ингибитора)	BOC-Y	HPAA	HBA	PABA	
WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 3)	1	NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	0.2	1.4	0.1	0.1	0.3	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	0.0	3.5	0.0	0.1	0.9	
	2	NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	1.0	31.8	8.2	16.3	15.3	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	0.9	0.5	1.0	1.3	0.7	
	3	NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	3.2	1.2	3.2	3.7	2.0	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	1.8	0.9	2.3	2.9	1.7	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	4.2	55.0	44.2	49.9	60.9	
	4	NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	5.1	0.0	0.9	0.6	0.2	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	5.5	0.9	6.3	4.5	3.4	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	17.5	2.1	16.9	11.4	8.2	
	5	NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	5.2	1.5	9.7	6.4	5.1	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	3.2	0.0	0.1	0.0	0.0	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	11.5	0.0	1.6	0.7	0.3	
	6	NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	6.1	0.0	1.4	0.5	0.3	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	22.0	0.0	3.8	1.5	0.8	
		NH <sub>2</sub> -WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQK	12.6	0.0	0.3	0.1	0.0	
	TTPPVLDSDGSFFLYSK (SEQ ID NO: 4)	1	NH <sub>2</sub> -TTPPVLDSDGSFFLYSK	0.0	5.2	0.0	0.3	1.3
			NH <sub>2</sub> -TTPPVLDSDGSFFLYSK	0.0	1.5	0.3	0.8	0.5
2		NH <sub>2</sub> -TTPPVLDSDGSFFLYSK	0.8	1.1	1.1	1.1	1.1	
		NH <sub>2</sub> -TTPPVLDSDGSFFLYSK	73.0	90.5	91.7	93.5	93.3	
3		NH <sub>2</sub> -TTPPVLDSDGSFFLYSK	26.1	1.5	6.9	4.3	3.8	

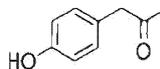
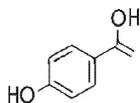
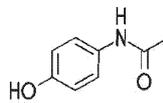
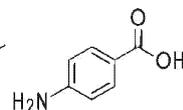
Фиг. 9



Фиг. 10



п-крезол

Гидроксифенилуксусная  
кислота (HPAA)Гидроксибензойная  
кислота (HBA)Ацетаминофен  
(тайленол)п-аминобензойная  
кислота (РАВА)

Фиг. 11

