



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.16

(21) Номер заявки
202191841

(22) Дата подачи заявки
2020.01.16

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

(54) СПОСОБЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СВОБОДНЫХ ТИОЛОВ В БЕЛКАХ

(31) 62/792,994

(32) 2019.01.16

(33) US

(43) 2021.10.07

(86) PCT/US2020/013910

(87) WO 2020/150492 2020.07.23

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

(72) Изобретатель:
Е Соок Йен, Брэмхолл Дэвид, Цю
Хайбо (US)

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

(56) KUAN-TING PAN ET AL.: "Mass Spectrometry-Based Quantitative Proteomics for Dissecting Multiplexed Redox Cysteine Modifications in Nitric Oxide-Protected Cardiomyocyte Under Hypoxia", ANTIOXIDANTS AND REDOX SIGNALING, vol. 20, no. 9, 20 March 2014 (2014-03-20), pages 1365-1381, XP055686764, US, ISSN: 1523-0864, DOI:10.1089/ars.2013.5326, see Figs. 1-3, p. 1366-1369, 1377

SHAKIR SHAKIR ET AL.: "Quantitative analysis of the cysteine redoxome by iodoacetyl tandem mass tags", CORESTA PTM TECHNICAL REPORT, SPRINGER BERLIN HEIDELBERG, DE, vol. 409, no. 15, 7 April 2017 (2017-04-07), pages 3821-3830, XP036233028, ISSN: 1618-2642, DOI:10.1007/S00216-017-0326-6 [retrieved on 2017-04-07] see p. 3822-3824, Fig. 1

GUO Y. ET AL.: "Counting Sulfhydryls and Disulfide Bonds in Peptides and Proteins Using Mercurial Ions as an MS-Tag", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, ELSEVIER SCIENCE INC, US, vol. 19, no. 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 1108-1113, XP023521706, ISSN:

1044-0305, DOI:10.1016/J.JASMS.2008.05.005 [retrieved on 2008-05-08] see p. 1108-1109

SEIWERT ET AL.: "Differential Labeling of Free and Disulfide-Bound Thiol Functions in Proteins", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, ELSEVIER SCIENCE INC, US, vol. 19, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1-7, XP022425104, ISSN: 1044-0305, DOI:10.1016/J.JASMS.2007.10.001, see p. 2-3

FURUKI KENICHIRO ET AL.: "Determination of thiol-to-protein ratio and drug-to-antibody ratio by in-line size exclusion chromatography with post-column reaction", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS, AMSTERDAM, NL, vol. 527, 18 April 2017 (2017-04-18), pages 33-44, XP085009882, ISSN: 0003-2697, DOI:10.1016/J.AB.2017.04.008, see p. 34-36

HONGBIN LIU ET AL.: "Characterization of free thiol variants of an IgG1 by reversed phase ultra high pressure liquid chromatography coupled with mass spectrometry", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS, vol. 109, 1 May 2015 (2015-05-01), pages 142-149, XP055686795, AMSTERDAM, NL, ISSN: 0731-7085, DOI:10.1016/j.jpba.2015.02.015, see p. 143-148

US-A1-2013309689
PRISCILLE GIRON ET AL.: "Cysteine tagging for MS-based proteomics", MASS SPECTROMETRY REVIEWS., vol. 30, no. 3, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 366-395, XP055538942, US, ISSN: 0277-7037, DOI: 10.1002/mas.20285, the whole document

KAZUTAKA ARAKI ET AL.: "Redox Sensitivities of Global Cellular Cysteine Residues under Reductive and Oxidative Stress", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 15, no. 8, 15 July 2016 (2016-07-15), pages 2548-2559, XP055686771, ISSN: 1535-3893, DOI:10.1021/acs.jproteome.6b00087, the whole document

ANJA RESEMANN ET AL.: "Rapid, automated characterization of disulfide bond scrambling and IgG2 isoform determination", MABS, vol. 10, no. 8, 2 October 2018 (2018-10-02), pages 1200-1213, XP055684883, US, ISSN: 1942-0862, DOI:10.1080/19420862.2018.1512328, the whole document

(57) В изобретении предлагаются композиции и способы для идентификации свободных тиолов в белках, иллюстративный способ мечения пептидов тэгом для идентификации свободных тиолов и тэгом для идентификации нативных дисульфидных связей и анализ тэгов с использованием нацеленной MS². В одном варианте осуществления способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В других вариантах осуществления способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG. В другом варианте осуществления

способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG. В другом варианте осуществления способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

047402 B1

047402 B1

Область техники изобретения

Изобретение в целом относится к системам и способам охарактеризования свободных тиольных групп в белках, в частности, в антителах.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет преимущество и приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/792994, поданной 16 января 2019 г., которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Уровень техники

При разработке моноклональных антител (мАт) от кандидата в лекарственное средство до рыночного продукта могут возникать проблемы со стабильностью, пост-трансляционными модификациями, или внесением других изменений в антитело. Изменения в структуре и функции антитела могут вызывать такие проблемы, как малый срок хранения или даже иммуногенность у пациента. Поэтому важно правильно охарактеризовать структуру антитела и наблюдать за ней в процессе производства. Контроль качества и обеспечение качества антитела являются критическими для чистоты и безопасности продуктов мАт.

Дисульфидные связи важны для структурной целостности, стабильности и биологических функций мАт. Ненативные дисульфидные связи могут вызывать изменения в структуре и стабильности мАт. Аффинность связывания мАт с антигенами может быть нарушена вплоть до 50%, если дисульфидные связи являются неполными (Xiang, T., et al., Anal Chem, 81:8101-8108 (2009)). Низкая энергия диссоциации дисульфидных связей и высокая гибкость шарнирной области часто приводят к модификациям и разрывам в шарнирной области (Moritz, B., and Stracke, J.O., Electrophoresis, 36:769-785 (2017)). Кроме того, введение человеку структур с ненативными дисульфидными связями может вызвать нежелательные иммунные реакции. Поэтому анализ дисульфидных связей важен для оценки контроля качества мАт. Современные способы анализа дисульфидных связей мАт являются времязатратными и трудоемкими.

Следовательно, целью данного изобретения является предоставление систем и способов для охарактеризования антител, в частности, дисульфидных связей в моноклональных антителах.

Другой вариант осуществления предлагает способ идентификации дисульфидной гетерогенности в белковом лекарственном продукте.

Другой целью данного изобретения является предоставление способов и композиций для идентификации свободных тиолов в белках, включающих в себя, но не ограниченных антителами.

Сущность изобретения

Предлагаются композиции и способы идентификации свободных тиолов (также называемых свободными сульфгидрилами). Свободные тиолы могут присутствовать в белках, например мАт, в результате неполного формирования дисульфидной связи или разрыва дисульфидной связи. Присутствие свободных тиолов может снизить термическую стабильность продуктов мАт и повлиять на их структурную целостность, стабильность и биологические функции. Поэтому важно характеризовать свободные тиолы в производстве мАт. В данном документе раскрываются способы идентификации сайт-специфичных свободных тиолов в белковых лекарственных продуктах. Иллюстративный способ включает в себя мечение пептидов тэгом для идентификации свободных тиолов и тэгом для идентификации нативных дисульфидных связей, и анализ тэгов с использованием нацеленной МС². В одном варианте осуществления, способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В других вариантах осуществления способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

Один вариант осуществления предлагает способ идентификации присутствия свободных тиолов в белке, например антителе или его фрагменте. Иллюстративный способ идентификации свободных тиолов в белковом лекарственном продукте включает в себя этапы мечения образца, содержащего белковый лекарственный продукт, первой меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер и первый МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Лишняя метка может быть удалена, и образец денатурируют и восстанавливают. Затем образец метят второй меткой, имеющей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и второй МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Способ включает в себя ферментативное расщепление образца и анализ образца с использованием масс-спектрометрии, например, системы сверхэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (система СЭЖХ-МС²), включающей в себя колонку с гибридными частицами с заряженной поверхностью и подвижную фазу в виде буфера с муравьиной кислотой. Затем способ включает в себя количественную оценку первого МС/МС-репортера и второго МС/МС-репортера, при этом количество первого МС/МС-репортера коррелирует с количеством свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, а количество второго МС/МС-репортера коррелирует с количеством связанных тиолов в белковом лекарственном продукте. В одном варианте осуществления, первый МС/МС-репортер

имеет массу 128, а второй МС/МС-репортер имеет массу 131. Белковый лекарственный продукт обычно представляет собой антитело, например моноклональное или химерное антитело. Присутствие свободных тиолов, вероятно, является результатом неполного формирования дисульфидной связи или разрушения дисульфидной связи. В одном варианте осуществления, способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В других вариантах осуществления, способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

Другой вариант осуществления предлагает способ идентификации дисульфидной гетерогенности в белковом лекарственном продукте, включающий в себя этапы мечения образца, содержащего белковый лекарственный продукт, первой меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и первый МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Лишняя метка может быть удалена, и образец денатурируют и восстанавливают. Затем образец метят второй меткой, имеющей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и второй МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Способ включает в себя ферментативное расщепление образца и анализ образца с использованием масс-спектрометрии, например, системы сверхэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (система СЭЖХ-МС²), включающей в себя колонку с гибридными частицами с заряженной поверхностью и подвижную фазу в виде буфера с муравьиной кислотой. Затем, способ включает в себя количественную оценку первого МС/МС-репортера и второго МС/МС-репортера, при этом количество первого МС/МС-репортера коррелирует с количеством свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, а количество второго МС/МС-репортера коррелирует с количеством связанных тиолов в белковом лекарственном продукте. Если анализ обнаруживает свободные тиолы в белковом лекарственном продукте, белковый лекарственный продукт содержит дисульфидную гетерогенность. Присутствие таких свободных тиолов, вероятно, является результатом неполного формирования дисульфидной связи или разрушения дисульфидной связи. В одном варианте осуществления, первый МС/МС-репортер имеет массу 128, а второй МС/МС-репортер имеет массу 131. Белковый лекарственный продукт, как правило, представляет собой антитело, например моноклональное, химерное антитело, биспецифическое антитело, или их антигенсвязывающие фрагменты. В одном варианте осуществления, способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В других вариантах осуществления, способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

Способ для отбора белкового лекарственного продукта включает в себя этапы мечения образца, содержащего белковый лекарственный продукт, первой меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и первый МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Лишняя метка может быть удалена, и образец денатурируют и восстанавливают. Затем образец метят второй меткой, имеющей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и второй МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Способ включает в себя ферментативное расщепление образца и анализ образца с использованием системы сверхэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (система СЭЖХ-МС²), включающей в себя колонку с гибридными частицами заряженной поверхностью и подвижную фазу в виде буфера с муравьиной кислотой. Затем, способ включает в себя количественную оценку первого МС/МС-репортера и второго МС/МС-репортера, при этом количество первого МС/МС-репортера коррелирует с количеством свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, а количество второго МС/МС-репортера коррелирует с количеством связанных тиолов в белковом лекарственном продукте. Если обнаруживают свободный тиол, то белковый лекарственный продукт обладает дисульфидной гетерогенностью. Способ включает в себя отбор белкового лекарственного продукта, который не демонстрирует дисульфидной гетерогенности. В одном варианте осуществления, первый МС/МС-репортер имеет массу 128, а второй МС/МС-репортер имеет массу 131. Белковый лекарственный продукт, как правило, представляет собой антитело, например моноклональное, химерное антитело, или биспецифическое антитело, или их антигенсвязывающие фрагменты. Другой вариант осуществления предлагает фармацевтическую композицию, содержащую белковый лекарственный продукт, отобранный с использованием способа, описанного выше. В одном варианте осуществления, способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В других вариантах осуществления, способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А является схематической иллюстрацией четырех реагентов IodoTMTsixplex. Фиг. 1В является схематической иллюстрацией типового потока операций для мечения пептидов метками IodoTMT.

Фиг. 2 является схематической иллюстрацией типового потока операций для анализа меченных IodoTMT пептидов с использованием нацеленной MS².

Фиг. 3А, 3В представляют собой результаты-хроматограммы MS²-анализа пептидов, меченных IodoTMT, запущенного с зависимостью от данных (фиг. 3А), или нацеленной MS² со списком включений (фиг. 3В). Ось Х представляет время, а ось Y - относительное содержание.

Фиг. 4А, 4В представляют собой результаты-хроматограммы для MS²-анализа пептидов, меченных IodoTMT, при специальной фокусировке на тэги TMT 128/131. Фиг. 4А представляет собой полную хроматограмму, а фиг. 4В является увеличенный участок с тэгами TMT 128/131. Ось Х представляет время, а ось Y - относительное содержание.

Фиг. 5А-5Г представляют собой результаты-хроматограммы MS²-анализа пептидов, меченных IodoTMT, из различных партий антитела. Ось Х представляет время, а ось Y - относительное содержание.

Фиг. 6 представляет собой гистограмму, демонстрирующую относительное содержание различных остатков цистеина из исследования с внутренним стандартом (spike-in study), в котором 10%, 5%, 1%, 0,5% или 0,1% белкового образца 1 были добавлены в белковый образец 2.

Фиг. 7 представляет собой гистограмму, демонстрирующую относительное содержание различных пар дисульфидных связей цистеина в партиях 1-3 антитела из производственного процесса А и в партиях 4-6 антитела из производственного процесса В. Пары дисульфидных связей обозначены изогнутыми линиями, соединяющими два цистеина.

Подробное описание сущности изобретения

I. Определения.

Следует понимать, что это описание не ограничивается описанными в данном документе композициями и способами, а также описанными экспериментальными условиями, поскольку таковые могут варьироваться. Следует также понимать, что употребляемая в данном документе терминология применяется только для описания определенных вариантов осуществления и не имеет ограничительного характера, поскольку объем данного описания будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой принадлежит данное описание. Хотя, при практическом применении или при тестировании данного изобретения могут быть использованы любые композиции, способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе. Все упомянутые публикации полностью включены в данный документ посредством ссылки.

Использование существительных в единственном числе в контексте описания ныне заявленного изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должно истолковываться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если иное не указано в данном документе или явно не противоречит контексту.

Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для того, чтобы служить кратким способом отдельной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон до тех пор, пока в данном документе не будет указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно указано в данном документе.

Использование термина "около" предназначено для описания значений либо больше, либо меньше указанного значения в диапазоне примерно $\pm 10\%$; в других вариантах осуществления значения могут варьировать в сторону либо большего, либо меньшего от указанного значения в диапазоне примерно $\pm 5\%$; в других вариантах осуществления значения могут варьировать в сторону либо большего, либо меньшего от указанного значения в диапазоне примерно $\pm 2\%$; в других вариантах осуществления значения могут варьировать в сторону либо большего, либо меньшего от указанного значения в диапазоне примерно $\pm 1\%$. Задумано, что вышеуказанные диапазоны будут прояснены контекстом, и не предполагается каких-либо дополнительных ограничений. Все способы, описанные в данном документе, могут выполняться в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иным образом явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров, или вводных слов примеров (например, "такой как"), представленных в данном документе, просто предназначено для лучшего освещения изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не следует истолковывать как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического применения изобретения.

"Белок" относится к молекуле, содержащей два или большее количество аминокислотных остатков, соединенных друг с другом пептидной связью. Белок включает в себя полипептиды и пептиды, а также

может включать в себя модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, и белки включают в себя, среди прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела, и химерные или гибридные белки. Белки производятся различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных способов культивирования клеток, и в целом вводятся в клетку методами генной инженерии (например, в виде последовательности, кодирующей химерный белок, или кодон-оптимизированной последовательности, последовательности без интронов, и т.д.), где она может находиться в виде эписомы или быть интегрирована в геном клетки.

"Антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает в себя ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает в себя молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные с помощью рекомбинантных способов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин "антитело" также включает в себя биспецифическое антитело, которое включает в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с больше чем одним отличающимся эпитопом. Биспецифические антитела в целом описаны в патенте США № 8586713, который включен в данную заявку посредством ссылки.

"Шарнирная область" относится к гибкому аминокислотному участку в центральной части тяжелых цепей иммуноглобулинов классов IgG и IgA, который соединяет данные 2 цепи через дисульфидные связи. В иммуноглобулинах IgG шарнирная область расположена между константными доменами CH1 и CH3. Шарнирная область придает антителу гибкости и облегчает связывание с антигеном.

"Гибридные белки Fc" содержат часть или весь двух или большего количества белков, одна(один) из которых является частью Fc молекулы иммуноглобулина, которые иначе не встречаются вместе в природе. Получение гибридных белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая домен Fc), было описано, например, Rath, T., et al., *Crit Rev Biotech*, 35(2): 235-254 (2015), Levin, D., et al., *Trends Biotechnol*, 33(1): 27-34 (2015)). "Гибридные рецепторные белки Fc" содержат один или большее количество внеклеточных доменов рецептора, соединенных с фрагментом Fc, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, гибридный белок Fc содержит две или большее количество отдельных рецепторных цепей, которые связываются с одним или большим количеством лигандов. Например, гибридный белок Fc представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка ИЛ-1 или ловушка VEGF.

Термин "дисульфидная связь" относится к связи, образованной окислением двух групп SH, каждая из которых присоединена к цистеину. Дисульфидные связи играют важную роль в свертывании и стабильности многих белков. IgG включают в себя две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), ковалентно соединенные в общей сложности 16 меж- или внутримолекулярными дисульфидными связями. mAb IgG содержат 32 остатка цистеина, 5 остатков цистеина на каждой LC и 11 остатков цистеина на каждой HC. Каждая LC содержит один переменный домен и один константный домен с соединением в виде дисульфидной связи. 5-й цистеин на LC соединяется либо с 3-м, либо с 5-м цистеином HC с формированием межцепочечной дисульфидной связи. Тяжелые цепи включают в себя N-концевой переменный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3) с шарнирной областью между CH1 и CH2 (Vidarsson, G., et al., *Front Immunol*, 5:520 (2014)). 6-й и 7-й цистеин на каждой HC соединены связью, формируя шарнирную область. Шарнирная область иммуноглобулина помогает сформировать Y-образную структуру молекулы иммуноглобулина. Y-образная форма молекулы иммуноглобулина допускает гибкость, необходимую для связывания антигена.

Термин "ЖХ-МС" относится к жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии, которая представляет собой метод аналитической химии, который сочетает в себе возможности физического разделения жидкостной хроматографии (или ВЭЖХ) с возможностями масс-анализа масс-спектрометрии (МС). Термин МС/МС или МС² относится к тандемной масс-спектрометрии.

Термины "свободные тиолы" и "свободные сульфгидрилы" используются взаимозаменяемо.

II. Способы идентификации свободных тиолов.

Предлагаются способы для идентификации свободных тиолов в белках, включающих в себя, но не ограничивающихся антителами. Тиол или сульфгидрил в целом относится к органическому соединению, содержащему группу $-SH$. В белках любые два цистеина в непосредственной близости формируют ковалентную связь, даже цистеины, которые в естественных условиях не формируют пары. Эта ковалентная связь между двумя цистеинами называется дисульфидной связью. Дисульфидные связи являются критичными для третичной структуры, стабильности и биологической функции IgG. Свободный тиол или свободный сульфгидрил относится к цистеину в белке, который не является частью дисульфидной связи, и может указывать на формирование неправильной структуры в белке, что может привести к неблагоприятным воздействиям на активность белкового лекарственного средства, период полужизни, стабильность, или сделать белковый препарат неэффективным. Свободные сульфгидрилы (также называемые свободными тиолами) также могут возникать в результате неполного формирования дисульфидной связи или разрушения дисульфидной связи. Повышенное содержание свободных сульфгидрилов может привести к снижению термической стабильности и может повлиять на аффинность связывания антител с антигенами вплоть до 50%. В данном документе раскрыты способы идентификации свободных сульфгидрилов или свободных тиолов.

A. Способы для идентификации сайт-специфичных свободных тиолов.

Свободные тиолы могут присутствовать в мАт, в результате неполного формирования дисульфидной связи или разрыва дисульфидной связи. Присутствие свободных тиолов может снизить термическую стабильность продуктов мАт и повлиять на их структурную целостность, стабильность и биологические функции. Поэтому важно характеризовать свободные тиолы в производстве мАт. В данном документе раскрываются способы идентификации сайт-специфичных свободных тиолов в белковых лекарственных продуктах. Иллюстративный способ включает в себя мечение пептидов тэгом для идентификации свободных тиолов и тэгом для идентификации нативных дисульфидных связей, и анализ тэгов с использованием нацеленной МС². В одном варианте осуществления, способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В другом варианте осуществления, способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В других вариантах осуществления, способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

Один вариант осуществления предлагает способ идентификации присутствия свободных тиолов в белке, например антителе или его фрагменте. Иллюстративный способ идентификации свободных тиолов в белковом лекарственном продукте включает в себя этапы мечения образца, содержащего белковый лекарственный продукт, первой меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер и первый МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Лишняя метка может быть удалена, и образец денатурируют и восстанавливают. Затем образец мечают второй меткой, имеющей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и второй МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Способ включает в себя ферментативное расщепление образца и анализ образца с использованием масс-спектрометрии, например, системы сверхэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (система СЭЖХ-МС²), включающей в себя гибридную колонку с заряженной поверхностью и подвижную фазу в виде буфера с муравьиной кислотой. Затем, способ включает в себя количественную оценку первого МС/МС-репортера и второго МС/МС-репортера, при этом количество первого МС/МС-репортера коррелирует с количеством свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, а количество второго МС/МС-репортера коррелирует с количеством связанных тиолов в белковом лекарственном продукте. В одном варианте осуществления, первый МС/МС-репортер имеет массу 128, а второй МС/МС-репортер имеет массу 131. Белковый лекарственный продукт обычно представляет собой антитело, например моноклональное или химерное антитело. Присутствие свободных тиолов, вероятно, является результатом неполного формирования дисульфидной связи или разрушения дисульфидной связи. В одном варианте осуществления, способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В других вариантах осуществления, способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

Другой вариант осуществления предлагает способ идентификации дисульфидной гетерогенности в белковом лекарственном продукте, включающий в себя этапы мечения образца, содержащего белковый лекарственный продукт, первой меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и первый МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Лишняя метка может быть удалена, и образец денатурируют и восстанавливают. Затем образец мечают второй меткой, имеющей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и второй МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Способ включает в себя

ферментативное расщепление образца и анализ образца с использованием масс-спектрометрии, например, системы сверхэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (система СЭЖХ-МС²), включающей в себя гибридную колонку с заряженной поверхностью и подвижную фазу в виде буфера с муравьиной кислотой. Затем, способ включает в себя количественную оценку первого МС/МС-репортера и второго МС/МС-репортера, при этом количество первого МС/МС-репортера коррелирует с количеством свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, а количество второго МС/МС-репортера коррелирует с количеством связанных тиолов в белковом лекарственном продукте. Если анализ обнаруживает свободные тиолы в белковом лекарственном продукте, белковый лекарственный продукт содержит дисульфидную гетерогенность. Присутствие таких свободных тиолов, вероятно, является результатом неполного формирования дисульфидной связи или разрушения дисульфидной связи. В одном варианте осуществления, первый МС/МС-репортер имеет массу 128, а второй МС/МС-репортер имеет массу 131. Белковый лекарственный продукт, как правило, представляет собой антитело, например моноклональное, химерное антитело, биспецифическое антитело, или их антигенсвязывающие фрагменты. В одном варианте осуществления, способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В других вариантах осуществления, способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

Способ для отбора белкового лекарственного продукта включает в себя этапы мечения образца, содержащего белковый лекарственный продукт, первой меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и первый МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Лишняя метка может быть удалена, и образец денатурируют и восстанавливают. Затем образец метят второй меткой, имеющей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер, и второй МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера. Способ включает в себя ферментативное расщепление образца и анализ образца с использованием системы сверхэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (система СЭЖХ-МС²), включающей в себя гибридную колонку с заряженной поверхностью и подвижную фазу в виде буфера с муравьиной кислотой. Затем, способ включает в себя количественную оценку первого МС/МС-репортера и второго МС/МС-репортера, при этом количество первого МС/МС-репортера коррелирует с количеством свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, а количество второго МС/МС-репортера коррелирует с количеством связанных тиолов в белковом лекарственном продукте. Если обнаруживают свободный тиол, то белковые лекарственные продукты обладают дисульфидной гетерогенностью. Способ включает в себя отбор белкового лекарственного продукта, который не демонстрирует дисульфидной гетерогенности. В другом варианте осуществления, выбранный белковый лекарственный продукт представляет собой IgG, который содержит меньше 5 свободных тиолов, меньше 4 свободных тиолов, меньше 3 свободных тиолов, меньше 2 свободных тиолов. В некоторых вариантах осуществления, свободный тиол находится в легкой цепи молекулы IgG. В некоторых вариантах осуществления, свободный тиол находится в тяжелой цепи молекулы IgG. В некоторых вариантах осуществления, имеется по меньшей мере один свободный тиол в легкой цепи и по меньшей мере один свободный тиол в тяжелой цепи молекулы IgG. В одном варианте осуществления, первый МС/МС-репортер имеет массу 128, а второй МС/МС-репортер имеет массу 131. Белковый лекарственный продукт, как правило, представляет собой антитело, например моноклональное, химерное антитело, или биспецифическое антитело, или их антигенсвязывающие фрагменты. Другой вариант осуществления предлагает фармацевтическую композицию, содержащую белковый лекарственный продукт, отобранный с использованием способа, описанного выше. В одном варианте осуществления, способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG. В других вариантах осуществления, способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG. В другом варианте осуществления, способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

1. Йодацетильные тэги.

В одном варианте осуществления пептиды могут быть помечены тэгами для идентификации нативных дисульфидных связей и свободных тиольных остатков. Тэг может представлять собой йодацетильную метку, которая метит цистеинсодержащие пептиды. Примеры тегов включают в себя, но не ограничиваются Thermo Scientific™ Iodoacetyl Tandem Mass Tag™ (iodoTMT™). Йодацетильные тэги необратимо метят свободные сульфгидрильные группы на остатках цистеина. Тэги включают в себя сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, нормализующее массу плечо, и МС/МС-репортер. Всего пять изотопных атомов, состоящих из комбинации 13C и 15N, включены в нормализующее массу плечо и область МС/МС-репортера в каждом реагенте, но они расположены в разных местах, отмеченных звездочками на фиг. 1А. В результате каждый реагент имеет одинаковую номинальную исходную массу, но уникальную массу для области МС/МС-репортера, которую можно различить на

спектрах МС/МС: 127 Да, 128 Да, 130 Да и 131 Да. В одном варианте осуществления, свободный тиол метят тэгом, имеющим массу 126, 127, 128, 129, 130 или 131 Да. В другом варианте осуществления, нативные дисульфидные связи метят тэгом, масса которого отличается от массы тэга, используемого для обнаружения свободного тиола. Неограничивающий пример включает в себя свободный тиол, помеченный тэгом, имеющим массу 127 Да, и нативную дисульфидную связь, помеченную тэгом, имеющим массу 130 Да.

Пример потока операций представлен на фиг. 1В. В одном варианте осуществления, аликвоту образца пептида смешивают с первым тэгом и инкубируют. Излишки реагента могут быть удалены из образца, а образец может быть денатурирован и восстановлен. В одном варианте осуществления, второй тэг массы добавляют к образцу после денатурирования образца. После добавления второго тэга образец может быть ферментативно расщеплен. Примеры способов ферментативного расщепления обсуждались выше. В другом варианте осуществления, два образца могут быть добавлены вместе перед дополнительным анализом. В некоторых вариантах осуществления, за один запуск может быть проанализировано до трех пар тэгов.

2. МС/МС.

В одном варианте осуществления, пептиды, меченные йодацетильным тэгом, анализируют с использованием масс-спектрометрии, например сверхэффективной жидкостной хроматографии (СЭЖХ) -МС/МС. В одном варианте осуществления, СЭЖХ выполняют на колонке с гибридными частицами с этиленовыми мостиками (ВЕН) или колонке с гибридными частицами с заряженной поверхностью (СН). Буферы могут представлять собой буферы трифторуксусной кислоты (ТФУК) или буферы муравьиной кислоты (МК). Жидкостная хроматография может длиться от около 90 мин до около 150 мин. Следует принять во внимание, что буферы и время прогона можно оптимизировать для конкретного анализируемого образца. В некоторых вариантах осуществления, прогон включает в себя этап повторного уравнивания продолжительностью около 40 мин. В предпочтительном варианте осуществления, СЭЖХ проводят на колонке СН 150 мм с использованием буферов МК в течение 150 мин с 40-минутным этапом повторного уравнивания.

После разделения пептидов с помощью СЭЖХ их можно анализировать с помощью масс-спектрологии. В предпочтительном варианте осуществления, используется нацеленная спектрометрия МС². Масс-спектрометр может представлять собой, например, гибридный квадрупольный масс-спектрометр Orbitrap® Thermo Scientific Q Exactive. Иллюстративный поток операций для нацеленной МС² показан на фиг. 10. Пептиды можно вводить в масс-спектрометр и анализировать с использованием параллельного мониторинга реакции. В одном варианте осуществления, фильтрация по массе прекурсоров выполняется в Q1 с последующей фрагментацией в ячейке HCD и детектированием ионов фрагментов с высоким разрешением/высокой точностью по массе (HR/HA) в масс-анализаторе Orbitrap®. В некоторых вариантах осуществления, пептиды захватываются в МС¹ для проверки правильности пептида при правильной массе. Репортерную метку отрывают от пептида в Orbitrap® МС², а затем количественно определяют в Orbitrap. Может быть вычислено относительное содержание каждого цистеина, соответствующего обнаруженной массе тэга.

В одном варианте осуществления, в сканирование МС² включают в включающий список масс. Например, массы конкретных цистеинов, представляющих интерес или вызывающих интерес, могут быть внесены программно в список включений. В одном варианте осуществления, применение списка включения может более точно определять интересующие остатки. В другом варианте осуществления, массы из списка исключения исключены из сканирования МС². Например, массы определенных цистеинов, которые, как известно, стабильны или редко формируют скремблированные связи, могут быть исключены из сканирования.

С. Белки интереса.

В одном варианте осуществления, белок интереса представляет собой белковый лекарственный продукт или белок интереса, подходящий для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Например, белок может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-гибридный белок или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент, или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент. Белки в комплексах могут быть простыми полипептидами, состоящими из одной субъединицы, или сложными многосубъединичными белками, содержащими две или большее количество субъединиц. Белок интереса может быть биофармацевтическим продуктом, пищевой добавкой или консервантом, или любым белковым продуктом, подлежащим очистке и проверке соответствия стандартам качества.

В некоторых вариантах осуществления, белок интереса представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизованное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антигенсвязывающего антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, тетравалентную иммуноглобулин G-подобную молекулу с двойной специфичностью, называемую иммуноглобулином с двойными переменными доменами (DVD-IG), антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело

IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления, антитело содержит химерный шарнир. В еще других вариантах осуществления, антитело содержит химерный Fc. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления, антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В других вариантах осуществления, антитело выбирают из группы, состоящей из: антитела к белку 1 запрограммированной клеточной гибели (например, анти-PD1 антитело, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела к лиганду 1 белка запрограммированной клеточной гибели (например, анти-PD-L1 антитело, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), анти-Dll4 антитела, ангиопоэтин-2 антитела (например, анти-ANG2 антитело, как описано в патенте США № 9402898), антитела к ангиопоэтин-подобному белку 3 (например, анти-AngPt13 антитело, как описано в патенте США № 9018356), антитела к рецептору тромбоцитарного фактора роста (например, анти-PDGFR антитело, как описано в патенте США № 9265827), анти-Erb3 антитела, антитела к рецептору пролактина (например, анти-PRLR антитело, как описано в патенте США № 9302015), антитела к комплементу 5 (например, анти-C5 антитело, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0313194A1), анти-ФНО антитела, антитела к рецептору эпидермального фактора роста (например, анти-EGFR антитело, как описано в патенте США № 9132192, или анти-EGFRvIII антитело, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0259423A1), антитела к пробелковой конвертазе субтилизин/кексин-9 (например, анти-PCSK9 антитело, как описано в патенте США № 8062640 или патенте США № 9540449), антитела к фактору роста и дифференцировки-8 (например, анти-GDF8 антитело, также известное как антитело к миостатину, как описано в патентах США № 8871209 или № 9260515), антитела к рецептору глюкогона (например, анти-GCGR антитело, как описано в публикациях заявок на патент США № US2015/0337045A1 или № US2016/0075778A1), анти-VEGF антитела, анти-ИЛ-1R антитела, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, анти-ИЛ-4R антитело, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271681A1, или патентах США № 8735095 или № 8945559), антитела к рецептору интерлейкина 6 (например, анти-ИЛ-6R антитело, как описано в патентах США № 7582298, № 8043617 или № 9173880), анти-ИЛ1 антитела, анти-ИЛ2 антитела, анти-ИЛ3 антитела, анти-ИЛ4 антитела, анти-ИЛ5 антитела, анти-ИЛ6 антитела, анти-ИЛ7 антитела, анти-интерлейкин 33 антитела (например, анти-ИЛ33 антитело, как описано в патентах США № 9453072 или № 9637535), антитела к респираторно-синцитиальному вирусу (например, анти-RSV антитело, как описано в публикации заявки на патент США № 9447173), антитела к кластеру дифференцировки 3 (например, анти-CD3 антитело, как описано в патентах США № 9447173 и № 9447173, и в заявке США № 62/222605), антитела к кластеру дифференцировки 20 (например, анти-CD20 антитело, как описано в патентах США № 9657102 и № US20150266966A1, и в патенте США № 7879984), анти-CD19 антитела, анти-CD28 антитела, антитела к кластеру дифференцировки 48 (например, анти-CD48 антитело, как описано в патенте США № 9228014), анти-Fel d1 антитела (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела к вирусу ближневосточного респираторного синдрома (например, анти-MERS антитело, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0337029A1), антитела к вирусу Эбола (например, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0215040), антитела к вирусу Зика, антитела к белку гена 3 активации лимфоцитов (например, анти-LAG3 антитело или анти-CD223 антитело), антитела к фактору роста нервов (например, анти-NGF антитело, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0017029, и патентах США № 8309088 и № 9353176), и антитела к Белку Y. В некоторых вариантах осуществления, биспецифическое антитело выбирают из группы, состоящей из: биспецифического анти-CD3 x анти-CD20 антитела (как описано в публикациях заявок на патент США № US2014/0088295A1 и № US20150266966A1), анти-CD3 x анти-муцин 16 биспецифического антитела (например, анти-CD3 x анти-Muc16 биспецифическое антитело), и биспецифического антитела к CD3 и к простат-специфическому мембранному антигену (например, анти-CD3 x анти-PSMA биспецифическое антитело). В некоторых вариантах осуществления, белок интереса выбирают из группы, состоящей из: абциксимаб, адалимумаб, адалимумаб-атто, адо-трастузумаба, алектузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаб ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаб пендетида, цертолизумаб пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтансинеалирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фасинумаба, голимумаба, гуселкумаба, ибритумомаб тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-abda, инфликсимаба-duyb, ипилиумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксибакумаба,

реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В некоторых вариантах осуществления, белок интереса представляет собой рекомбинантный белок, который содержит фрагмент Fc и другой домен (например, Fc-гибридный белок). В некоторых вариантах осуществления, Fc-гибридный белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или большее количество внеклеточных доменов рецептора, соединенных с фрагментом Fc. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент Fc содержит шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления, рецепторный Fc-слитый белок содержит две или большее количество отдельных рецепторных цепей, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, ловушка ИЛ-1 (например, рилонацепт, который содержит область связывания лиганда ИЛ-1RACp, слитую с внеклеточной областью ИЛ-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который включен в данный документ в полном объеме посредством ссылки), или ловушка VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, которая содержит домен 2 Ig VEGF-рецептора - Flt1, слитый с доменом 3 Ig VEGF-рецептора - Flk1, слитый с Fc hIgG1; см. патенты США № 7087411 и № 7279159). В других вариантах осуществления, Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-гибридный белок, который содержит один или большее количество из одного или большего количества антигенсвязывающих доменов, таких как фрагмент вариабельной области тяжелой цепи и фрагмент вариабельной области легкой цепи антитела, соединенного с фрагментом Fc.

D. Изготовление мАт с малой или отсутствующей гетерогенностью.

Один вариант осуществления предлагает способы изготовления белкового лекарственного продукта, содержащего малое количество, или не содержащего, свободных тиолов. Иллюстративный способ включает в себя культивирование клеток, продуцирующих антитело, в культуре клеток в подходящих условиях для получения антитела, очистку антитела в подходящих условиях для экстракции антитела, смешивание антитела с наполнителями в подходящих условиях для стабилизации антитела, получение образца антитела из клеточной культуры, после очистки антитела из клеточной культуры или после добавления наполнителей к очищенному антителу, охарактеризование дисульфидных связей антитела согласно раскрытым способам, и модификацию одного или большего количества условий клеточного культивирования, очистки или наполнителя для уменьшения количества перекрещенных шарнирных дисульфидных связей антитела.

Одно или большее количество условий культивирования клеток, очистки или наполнителя, которые изменяют для уменьшения количества свободных тиолов в антителе, включают в себя, но не ограничиваются температурой, рН, уровнями кислорода, активными формами кислорода, поверхностно-активными веществами или их комбинацией. В одном варианте осуществления, стратегия культивирования клеток без аминокислот может влиять на формирование дисульфидной связи.

В одном варианте осуществления, клетки, продуцирующие антитело, представляют собой клетки яичника китайского хомячка. В другом варианте осуществления, клетки представляют собой клетки гибридомы. В варианте осуществления, белковый лекарственный продукт представляет собой моноклональное антитело IgG или его фрагмент.

В одном варианте осуществления, белковый лекарственный продукт не содержит свободных тиолов. В другом варианте осуществления, белковый лекарственный продукт содержит меньше 5 свободных тиолов, меньше 4 свободных тиолов, меньше 3 свободных тиолов, меньше 2 свободных тиолов в молекуле IgG. В некоторых вариантах осуществления, свободный тиол находится в легкой цепи молекулы IgG. В некоторых вариантах осуществления, свободный тиол находится в тяжелой цепи молекулы IgG. В некоторых вариантах осуществления, имеется по меньшей мере один свободный тиол в легкой цепи и по меньшей мере один свободный тиол в тяжелой цепи молекулы IgG.

Примеры

Пример 1. Анализ сайт-специфичных свободных тиолов.

Способы.

Мечение цистеинов.

Следовали потоку операций из фиг. 1B. Если кратко, контрольный образец и образец антитела метили йодо-ТМТ реагентами (фиг. 1A). Избыток реагентов удаляли, образцы денатурировали и восстанавливали с использованием 0,5 М ТСЕР, и инкубировали в течение 1 ч. После денатурации и восстановления к образцам добавляли вторую метку. Затем образцы объединяли, ферментативно расщепляли и анализировали с помощью СЭЖХ-МС/МС. Условия СЭЖХ были следующими: Образцы прогоняли через колонку CSH 150 мм в течение 150 мин, включая 40-минутный этап повторного уравнивания. Использовались буферы МК.

Исследование с внутренним стандартом.

Для исследования с внутренним стандартом были приготовлены аликвоты двух разных образцов одного и того же белка. Белки денатурировали с использованием GuanHCl и восстанавливали. Образцы метили двумя разными тэгами IodoTMT. Затем был приготовлен градиент концентраций внутреннего

стандарта. К алиquotам белкового образца 2 добавляли 10%, 5%, 1%, 0,5% или 0,1% белкового образца 1. Затем образцы ферментативно расщепляли и анализировали с помощью СЭЖХ/МС-МС (фиг. 2).

Результаты.

В табл. 1 показаны результаты анализа нацеленной МС² антитела Regeneron, меченного тэгами йод-ТМТ, для идентификации сайт-специфичных свободных тиолов. Как видно из таблицы, были идентифицированы все шестнадцать остатков цистеина.

Фиг. 3А, 3В демонстрируют сравнение запуска МС², зависящей от данных, и запуска нацеленной МС² (со списком включения) для одного и того же образца. Как показано на фигурах, запуск нацеленной МС² со списком включений определенных цистеинов может помочь более интенсивно количественно определять конкретные остатки цистеина. Кроме того, использование тэгов йод-ТМТ в сочетании с нацеленной МС² позволяет лучше разделить меченые цистеины. Фиг. 4А, 4В демонстрируют четкое разделение меченного цистеина 128 Да и меченного цистеина 131 Да. Раскрытый способ обладает очень четким разделением, не заботясь о перекрывающихся шаблонах изотопов, что наблюдается в современных способах, таких как способы с меткой IAA.

Сравнивали разные партии одного и того же продукта антитела, чтобы дополнительно продемонстрировать полезность раскрытого способа. Фиг. 5А-5G демонстрируют относительное содержание свободных тиолов и цистеинов с дисульфидными связями в разных партиях одного и того же антитела.

Дополнительная валидация способа была выполнена с использованием исследования с внутренним стандартом. Различные процентные доли меченного белкового образца 1 добавляли к меченному белковому образцу 2. Фиг. 6 демонстрирует результаты исследования с внутренним стандартом. Большинство цистеинов показали ожидаемое количество свободных тиолов, которое можно было бы предсказать по количеству белкового образца 1, добавленного к белковому образцу 2, что указывает на то, что способ эффективен для прогнозирования относительного содержания свободных тиолов.

Таблица 1

		Результаты нацеленной МС ²					
		Начало	Конец			Время	
Масса [m/z]	Полярность	[мин]	[мин]	НХС (NCE)	CS [z]	Примечание	удерживания
827,7385	Положительная	57	63	30	3	C22H- 2481.2010	60,57
781,8890	Положительная	30	36	30	2	C96H- 1562.7694	33,72
797,4441	Положительная	40	46	30	2	C145H- 1593.8809	43,90
1748,1358	Положительная	72	78	30	4	C201H- 6985.5196	75,62
391,2077	Положительная	10	16	30	2	C221H- 781.4062	14,70
1130,2953	Положительная	58	64	30	3	C227H/C230H- 3388.8659	62,23
804,4156	Положительная	45	51	30	3	C262H- 2411.2322	48,67
500,2775	Положительная	16	22	30	2	C322H- 999.5477	19,64
717,4208	Положительная	42	48	30	2	C368H- 1433.8334	46,23
1025,4963	Положительная	46	52	30	3	C426H- 3073.4685	50,15
489,7835	Положительная	20	26	30	2	C23H- 978.5581	23,53
1637,7747	Положительная	64	70	30	3	C94H- 9411.3185	67,71
690,7049	Положительная	60	66	30	3	C140H- 2070.1001	63,31
716,7147	Положительная	35	41	30	3	C200H- 2148.1294	38,98
571,2846	Положительная	22	28	30	2	C220H- 1141.5597	25,24

Табл. 2 суммирует результаты по содержанию свободных тиолов и дисульфидных связей для продукта - антитела Regeneron. Для каждого цистеинового сайта рассчитывали процент сайт-специфичных свободных тиолов. Были идентифицированы и количественно определены все шестнадцать цистеинов. Был установлен порог в 5-6% свободных тиолов, и все что ниже порога не демонстрирует склонности к разрыву дисульфидной связи. Фиг. 7 показывает относительное содержание пар дисульфидных связей в различных партиях продукта - антитела Regeneron.

Раскрытые способы и результаты могут быть использованы для количественного определения совокупного количества сайт-специфичных свободных тиолов и в качестве потенциального индикатора сайтов дисульфидного скремблирования. Кроме того, это можно использовать для идентификации дисульфидов внутри цепи, приводящих к образованию половинчатой молекулы или агрегации.

Сравнение процессов

Дисульфидная связь		Содержание сайт-специфичных свободных тиолов (%)						Среднее	Среднеквадрат. отклонение
Дисульфидная связь	Сайт Cys	Процесс А			Процесс В				
		Партия 1	Партия 2	Партия 3	Партия 4	Партия 5	Партия 6		
C22H-C96H	C22H	0,09	0,10	0,08	0,08	0,07	0,10	0,09	0,01
	C96H	0,03	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,01
C144H-C200H	C144H	0,62	0,54	0,47	1,02	1,13	0,96	0,79	0,21
	C200H	0,99	0,87	0,87	1,44	1,37	1,34	1,15	0,24
C258H-C318H	C258H	0,48	0,42	0,42	0,78	0,86	0,88	0,64	0,15
	C318H	0,53	0,57	0,50	1,02	1,03	1,04	0,78	0,21
C364H-C422H	C364H	1,64	1,54	1,64	2,23	2,63	2,65	2,05	0,27
	C422H	2,22	2,05	1,96	2,34	3,03	2,97	2,43	0,14
C23H-C88H	C23H	0,09	0,11	0,10	0,11	0,10	0,13	0,11	0,01
	C88H	0,16	0,19	0,15	0,20	0,21	0,22	0,19	0,02
C134H-C194H	C134H	0,24	0,24	0,22	0,28	0,24	0,34	0,26	0,02
	C194H	0,07	0,04	0,05	0,08	0,08	0,10	0,07	0,02
Шарпир	C223H/226H	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C131H-C214H	C131H	0,18	0,18	0,19	0,20	0,22	0,21	0,20	0,01
	C214H	0,20	0,18	0,24	0,11	0,12	0,17	0,17	0,05

Хотя в вышеприведенном описании это изобретение было описано применительно к некоторым его вариантам осуществления, и многие детали были выдвинуты с целью иллюстрации, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что изобретение допускает дополнительные варианты осуществления, и что некоторые из деталей, описанных в данном документе, могут значительно варьироваться без отклонения от основных принципов изобретения.

Все источники, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки в их полном объеме. Данное изобретение может быть осуществлено в других конкретных формах без отклонения от сущности или его существенных атрибутов, и, соответственно, следует ссылаться на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, как на указание объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ для идентификации свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, включающий мечение образца, содержащего белковый лекарственный продукт, первой меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, MS-нейтральный спейсер и первый MS/MS-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера;

удаление излишка первой метки;

денатурацию и восстановление образца;

мечение образца второй меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, MS-нейтральный спейсер и второй MS/MS-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера;

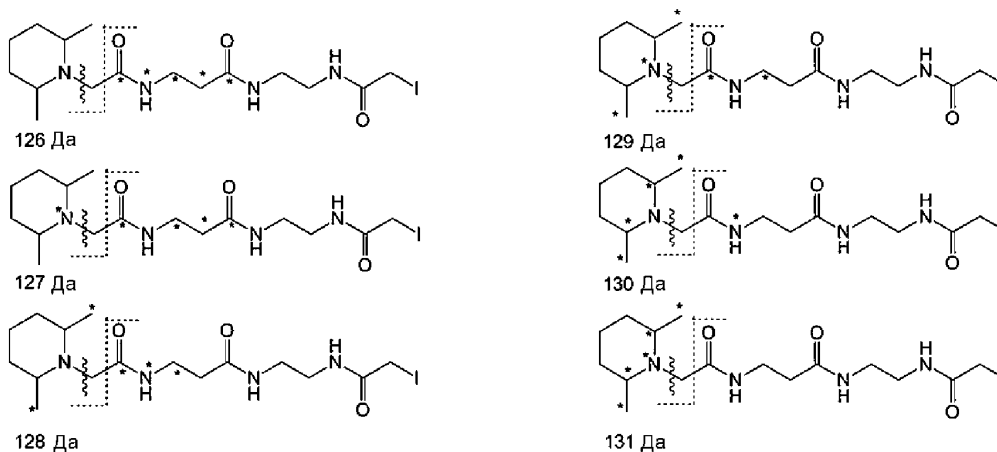
ферментативное расщепление образца;

анализ образца с использованием системы СЭЖХ-МС², содержащей колонку с гибридными частицами с заряженной поверхностью и подвижную фазу в виде буфера муравьиной кислоты; и

количественное определение первого MS/MS-репортера и второго MS/MS-репортера, при этом количество первого MS/MS-репортера коррелирует с количеством свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, а количество второго MS/MS-репортера коррелирует с количеством связанных тиолов в белковом лекарственном продукте, где установлен порог в 5-6% свободных тиолов и все, что ниже порога, не демонстрирует склонности к разрыву дисульфидной связи.

2. Способ по п.1, где первый MS/MS-репортер имеет массу 128 Да, а второй MS/MS-репортер имеет массу 131 Да.

3. Способ по п.1, где первую и вторую метки выбирают из группы, состоящей из



4. Способ по любому из пп.1-3, где способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG.

5. Способ по любому из пп.1-3, где способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG.

6. Способ по любому из пп.1-3, где способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG.

7. Способ по любому из пп.1-3, где способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

8. Способ для идентификации дисульфидной гетерогенности в белковом лекарственном продукте, включающий следующие этапы:

мечение образца, содержащего белковый лекарственный продукт, первой меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер и первый МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера;

удаление излишка первой метки;

денатурацию и восстановление образца;

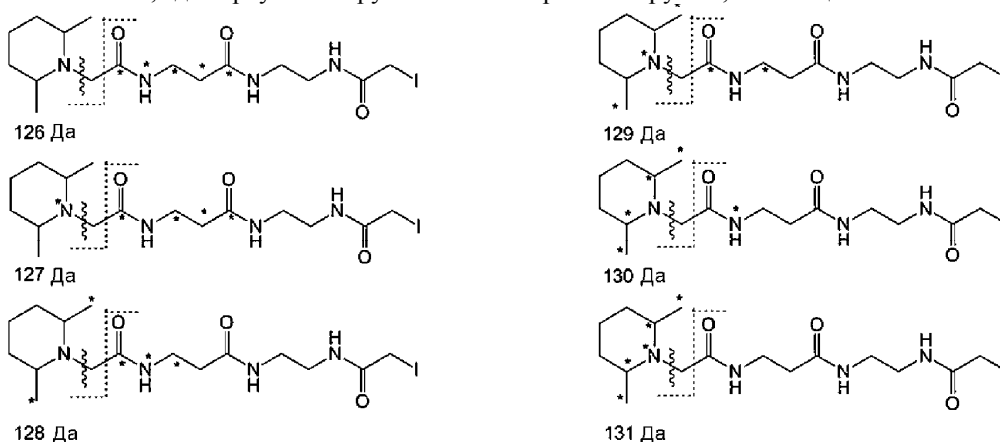
мечение образца второй меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер и второй МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера;

ферментативное расщепление образца;

анализ образца с использованием системы СЭЖХ-МС², содержащей колонку с гибридными частицами с заряженной поверхностью и подвижную фазу в виде буфера муравьиной кислоты; и

количественное определение первого МС/МС-репортера и второго МС/МС-репортера, при этом количество первого МС/МС-репортера коррелирует с количеством свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, а количество второго МС/МС-репортера коррелирует с количеством связанных тиолов в белковом лекарственном продукте, при этом обнаружение свободных тиолов указывает на то, что белковый лекарственный продукт имеет дисульфидную гетерогенность, где установлен порог в 5-6% свободных тиолов и все, что ниже порога, не демонстрирует склонности к разрыву дисульфидной связи.

9. Способ по п.8, где первую и вторую метки выбирают из группы, состоящей из



10. Способ по любому из п.8 или 9, где способ обеспечивает полный охват всех 32 остатков цистеина в молекуле IgG.

11. Способ по любому из пп.8-10, где способ охватывает 16 остатков цистеина на тяжелой и легкой цепях в молекуле IgG.

12. Способ по любому из пп.8-10, где способ охватывает 5 остатков цистеина на каждой легкой цепи молекулы IgG.

13. Способ по любому из пп.8-10, где способ охватывает 11 остатков цистеина на каждой тяжелой цепи молекулы IgG.

14. Способ для отбора белкового лекарственного продукта, включающий следующие этапы:

мечение образца, содержащего белковый лекарственный продукт, первой меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер и первый МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера;

удаление излишка первой метки;

денатурацию и восстановление образца;

мечение образца второй меткой, содержащей сульфгидрил-реактивную йодацетильную группу, МС-нейтральный спейсер и второй МС/МС-репортер, имеющий уникальную ионную массу репортера; ферментативное расщепление образца;

анализ образца с использованием системы СЭЖХ-МС², содержащей колонку с гибридными частицами с заряженной поверхностью и подвижную фазу в виде буфера муравьиной кислоты;

количественное определение первого МС/МС-репортера и второго МС/МС-репортера, при этом количество первого МС/МС-репортера коррелирует с количеством свободных тиолов в белковом лекарственном продукте, а количество второго МС/МС-репортера коррелирует с количеством связанных тиолов в белковом лекарственном продукте, где установлен порог в 5-6% свободных тиолов и все, что ниже порога, не демонстрирует склонности к разрыву дисульфидной связи; и

отбор белкового продукта в случае, если он имеет меньше 5 свободных тиолов или не имеет свободных тиолов.

15. Способ по п.14, где свободный тиол находится в легкой цепи молекулы IgG.

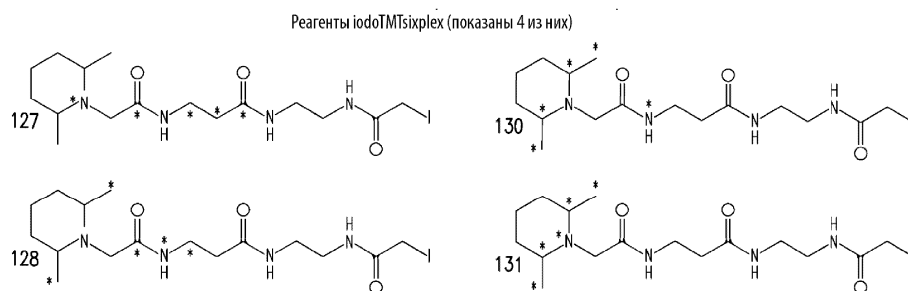
16. Способ по п.14, где свободный тиол находится в тяжелой цепи молекулы IgG.

17. Способ по п.14, где имеется по меньшей мере один свободный тиол в легкой цепи и по меньшей мере один свободный тиол в тяжелой цепи молекулы IgG.

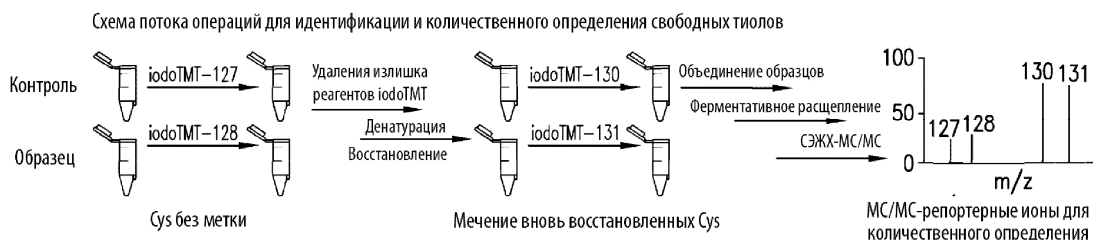
18. Способ по п.1, где указанный первый МС/МС-репортер имеет уникальную массу 126, 127, 128, 129, 130 и 131 Да, и указанный второй МС/МС-репортер имеет уникальную массу 126, 127, 128, 129, 130 или 131 Да, где указанные первый и второй МС/МС-репортеры можно различить на спектрах МС/МС.

19. Способ по п.1, где указанный белковый лекарственный продукт представляет собой IgG.

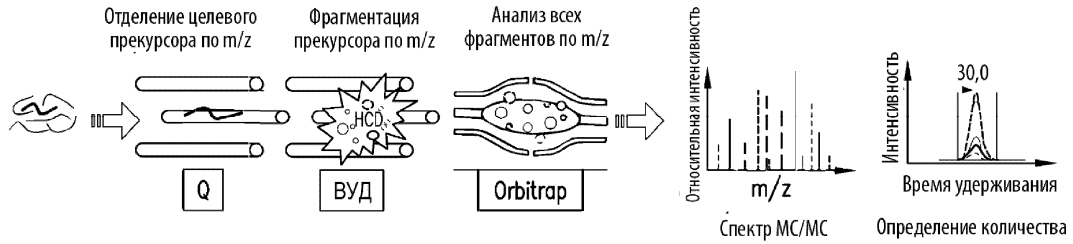
20. Способ по любому из п.8 или 10, где указанный белковый лекарственный продукт представляет собой IgG.



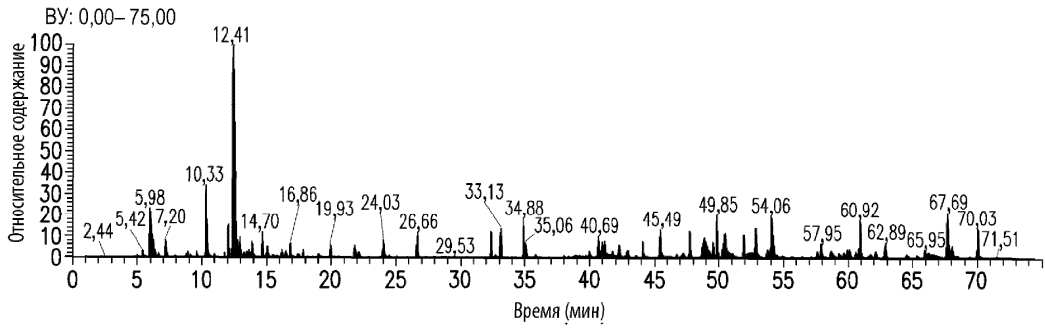
Фиг. 1А



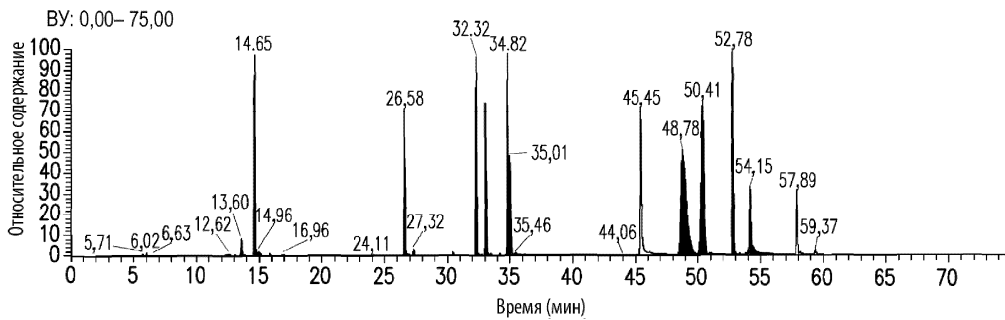
Фиг. 1В



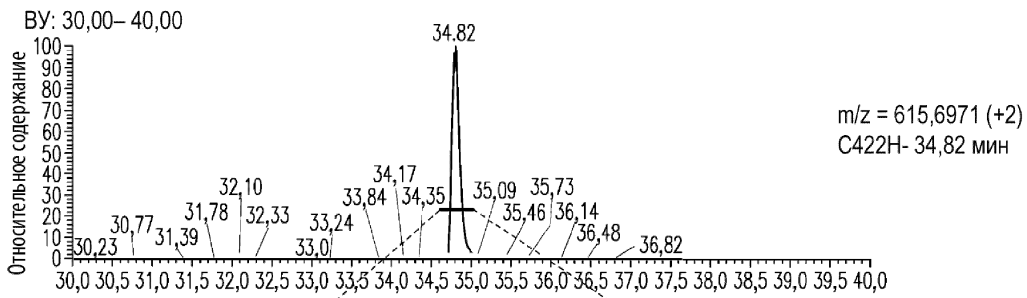
Фиг. 2



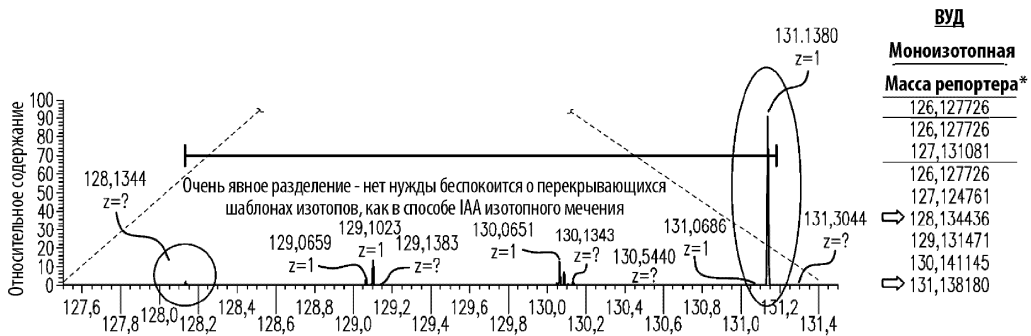
Фиг. 3А



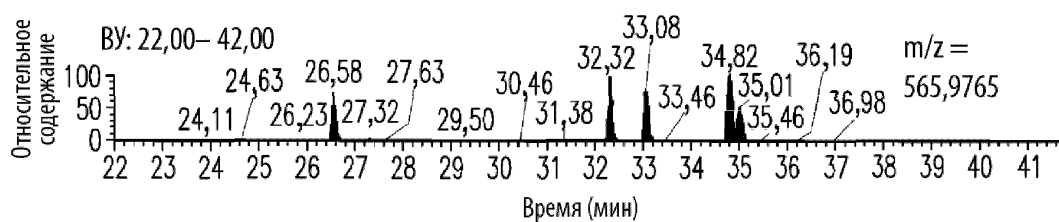
Фиг. 3В



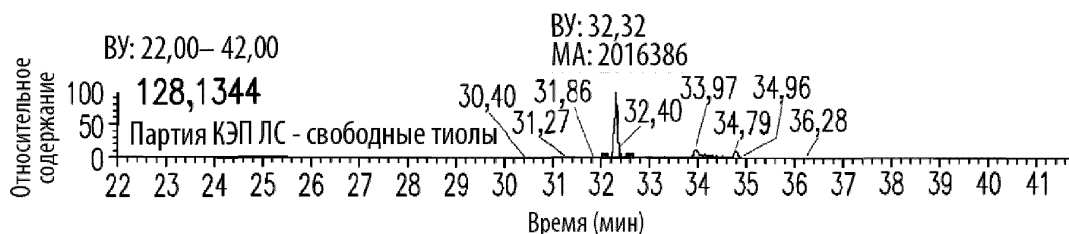
Фиг. 4А



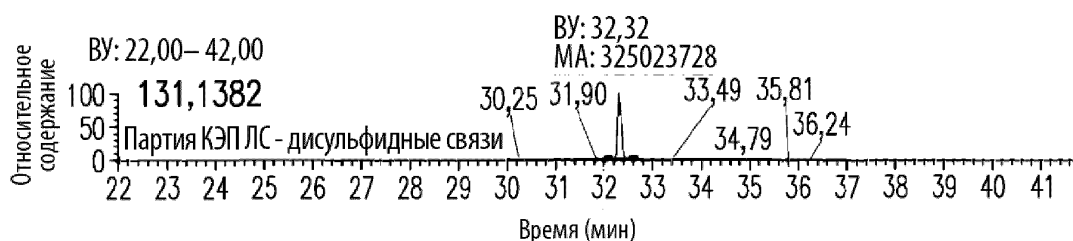
Фиг. 4В



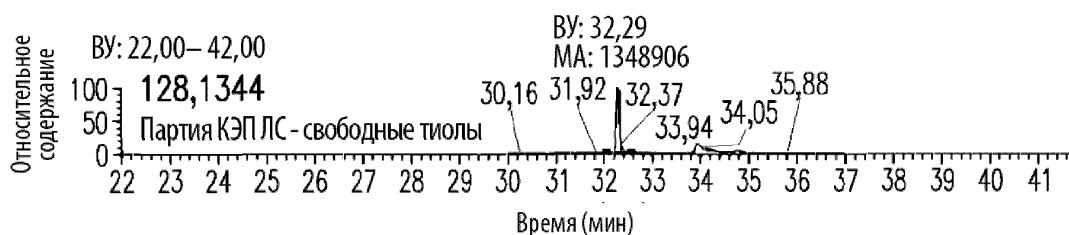
Фиг. 5А



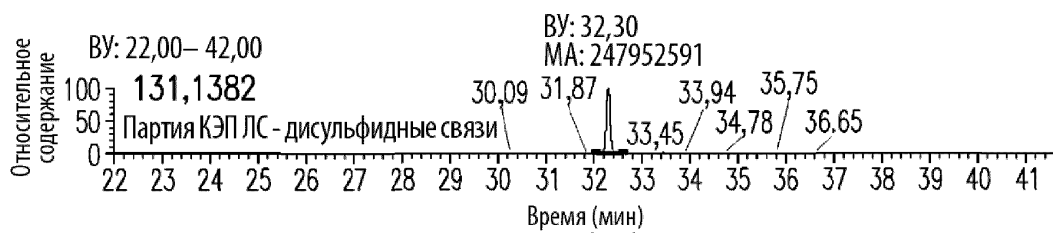
Фиг. 5В



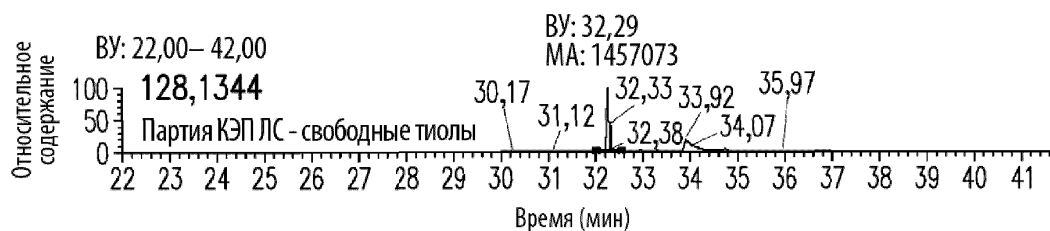
Фиг. 5С



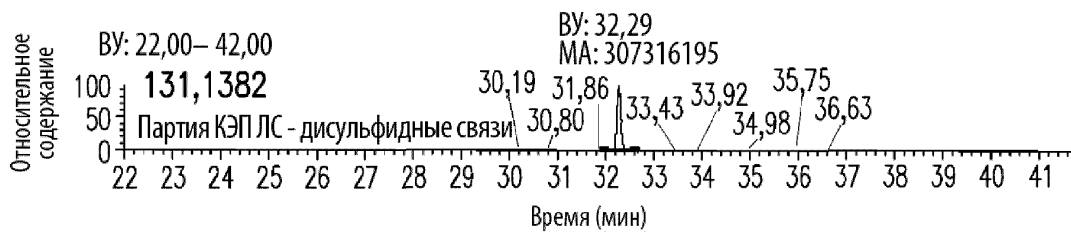
Фиг. 5D



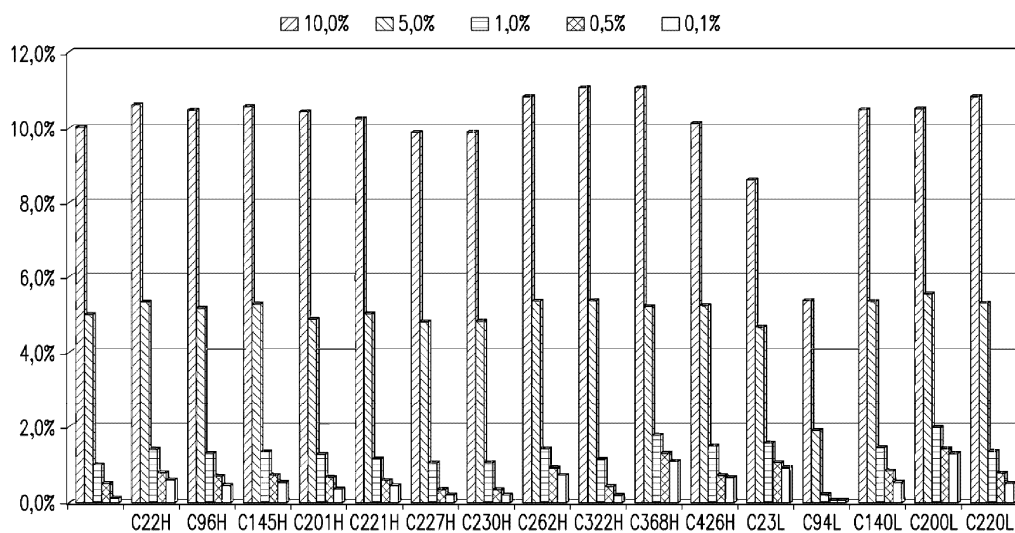
Фиг. 5Е



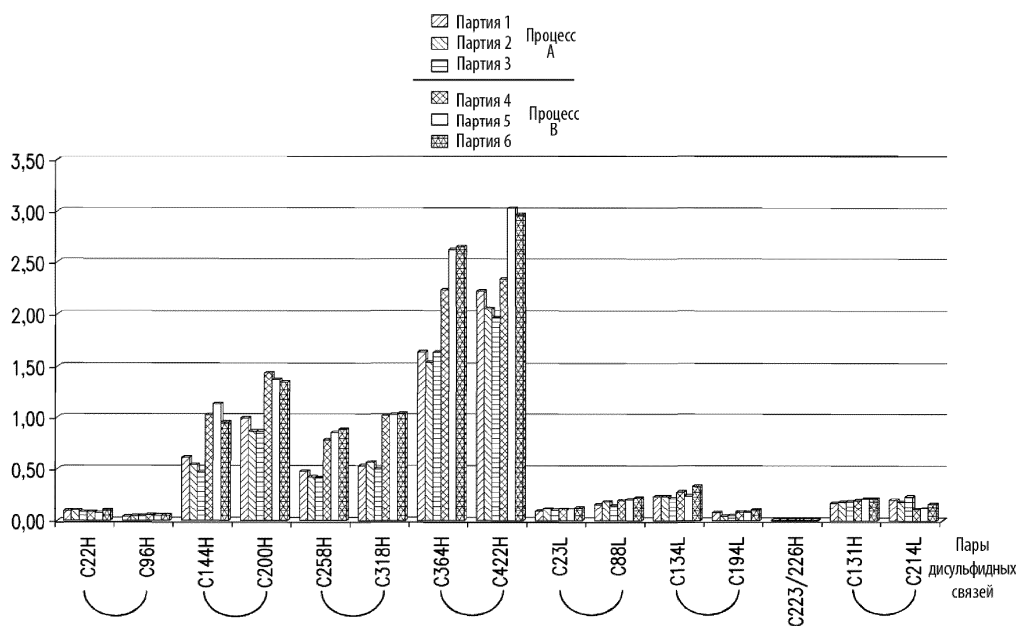
Фиг. 5F



Фиг. 5G



Фиг. 6



Фиг. 7

