

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490212 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.13

(22) Дата подачи заявки  
2022.07.12

(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)  
C07K 1/22 (2006.01)  
C07K 1/36 (2006.01)  
G01N 30/88 (2006.01)

(54) БИОАНАЛИЗ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ И РОДСТВЕННЫХ ПРОДУКТОВ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИИ И ОБНАРУЖЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ НАТИВНОЙ SCX-МС

(31) 63/221,439

(32) 2021.07.13

(33) US

(86) PCT/US2022/036873

(87) WO 2023/287826 2023.01.19

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

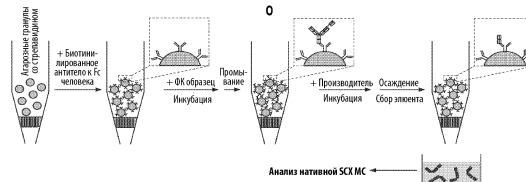
(72) Изобретатель:

Янь Юэтянь, Ванг Шунхай (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение в целом относится к способам определения характеристик антител и родственных продуктов. В частности, настоящее изобретение относится к использованию иммунопреципитации и нативной хроматографии с сильным катионным обменом с масс-спектрометрией для специфичного и чувствительного обнаружения и количественного определения антител и родственных продуктов в образце.



202490212

A1

A1

202490212

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580221EA/032

### БИОАНАЛИЗ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ И РОДСТВЕННЫХ ПРОДУКТОВ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИИ И ОБНАРУЖЕНИЯ ПОСРЕДСТВОМ НАТИВНОЙ SCX-МС

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной заявке на патент США № 63/221,439, поданной 13 июля 2021 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] Изобретение в целом относится к способам определения характеристик антител и родственных продуктов.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Для получения терапевтических пептидов или белков их экспрессируют в суспензии культуры клеток. Затем пептиды или белки очищают для удаления связанных со способом примесей. Качество продукта, свойственное очищенным терапевтическим пептидам или белкам, тщательно характеризуется, чтобы гарантировать сохранение соответствующих им профилей безопасности, эффективности и срока хранения, имеющих значение для фармакокинетики.

[4] Изменения терапевтических пептидов или белков могут произойти в любой момент во время и после процесса производства и/или очистки. Терапевтические пептиды или белки могут становиться гетерогенными из-за различных посттрансляционных модификаций, разложения белка, ферментативных модификаций и химических модификаций. Эти изменения биофизических характеристик биофармацевтических продуктов могут влиять на соответствующую безопасность, эффективность и срок хранения.

[5] Другие ключевые характеристики терапевтического пептида или белка включают в себя такие свойства, как фармакокинетика и фармакодинамика, которые определяют объем и расчет времени терапии *in vivo*. Понимание процесса обработки терапевтического средства *in vivo* может иметь важное значение для определения того, как лучше всего производить и доставлять это терапевтическое средство, например, для определения путей введения, дозировки, а также терапевтических и побочных эффектов.

[6] Точная и эффективная оценка этих характеристик терапевтического пептида или белка, часто в контексте комплексной матрицы, такой как сыворотка, которая усложняет обнаружение, требует высокопроизводительных, высокочувствительных и высокоспецифичных методов. Следует понимать, что существует потребность в способах и системах для достижения точного определения характеристик и количественного определения терапевтических пептидов и белков и их ключевых особенностей.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[7] Для обнаружения и количественного определения антител и родственных

продуктов был разработан способ нативной SCX-МС. Иммунопреципитацию с помощью агарозных гранул, покрытых антителом к Fc человека, можно использовать для удаления человеческого антитела в образце. Расщепляющий фермент IdeS или его вариант можно использовать для расщепления иммобилизованного антитела с получением Fab<sub>2</sub>-фрагмента, который можно элюировать и собирать. Затем этот фрагмент можно подвергнуть анализу нативной SCX-МС для чувствительного и надежного количественного определения. Было показано, что способ по настоящему изобретению эффективно и точно определяет количество антител даже при низких концентрациях, в чистом растворе или в сыворотке, как показано в приведенных примерах.

[8] В настоящем изобретении предложен способ определения характеристик антитела. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения способ включает в себя: (a) иммобилизацию указанного антитела на твердофазном субстрате; (b) приведение указанного иммобилизованного антитела в контакт с расщепляющим ферментом с получением несвязанного фрагмента указанного антитела; (c) элюирование указанного фрагмента антитела; и (d) подвергание указанного элюата анализу нативной SCX-МС для определения характеристик указанного антитела.

[9] В одном аспекте указанное антитело представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело.

[10] В одном аспекте указанная стадия иммобилизации включает в себя приведение образца, содержащего указанное антитело, в контакт с твердофазным субстратом, способным связываться с указанным антителом. В одном конкретном аспекте указанный образец представляет собой образец сыворотки.

[11] В одном аспекте указанный твердофазный субстрат содержит гранулы. В одном конкретном аспекте указанные гранулы представляют собой агарозные гранулы или магнитные гранулы.

[12] В одном конкретном аспекте указанное связывание указанного твердофазного субстрата осуществляют с помощью антитела, прикрепленного к указанному твердофазному субстрату. В одном дополнительном конкретном аспекте указанное антитело представляет собой антитело к Fc.

[13] В одном аспекте способ дополнительно включает в себя стадию промывания указанного твердофазного субстрата после иммобилизации указанного антитела.

[14] В одном аспекте указанный расщепляющий фермент представляет собой IdeS или его вариант. В другом аспекте указанный фрагмент антитела представляет собой Fab<sub>2</sub>-фрагмент.

[15] В одном аспекте указанное элюирование включает в себя стадию центрифугирования указанного твердофазного субстрата и фрагмента антитела.

[16] В одном аспекте указанная система SCX соединена с указанным масс-спектрометром. В другом аспекте указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр с тройным квадруполем.

[17] В одном аспекте указанное определение характеристик антитела включает в себя количественное определение антитела, причем указанное количественное определение необязательно нормализуют по внутреннему стандарту.

[18] Данные и другие аспекты настоящего изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении в сочетании со следующим описанием и сопровождающими графическими материалами. Нижеследующее описание, несмотря на указания различных вариантов реализации изобретения и их многочисленных конкретных деталей, приводится в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перегруппировки могут быть выполнены без выхода за пределы объема изобретения.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[19] На ФИГ. 1 проиллюстрирован рабочий процесс способа по настоящему изобретению в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[20] На ФИГ. 2 показано сравнение характеристик различных колонок SCX на общих ионных хроматограммах (TIC) SCX-МС для разделения антител в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[21] На ФИГ. 3А показаны TIC SCX-МС для ряда различных антител в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[22] На ФИГ. 3В показаны масс-спектры мАт1 при различных концентрациях в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[23] На ФИГ. 3С показаны масс-спектры мАт2 при различных концентрациях в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[24] На ФИГ. 4А показана TIC SCX-МС Fab<sub>2</sub> мАт1 и внутреннего стандарта Fab<sub>2</sub> мАт2 в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[25] На ФИГ. 4В показана линейность измеренной концентрации мАт1 в диапазоне от 20 пг до 20 нг в чистом растворе по сравнению с внутренним стандартом в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[26] На ФИГ. 4С показана линейность измеренной концентрации мАт1 в диапазоне от 20 нг до 2 мкг в чистом растворе по сравнению с внутренним стандартом в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[27] На ФИГ. 4D показаны масс-спектры мАт1 при концентрациях от 20 пг до 2 мкг в чистом растворе в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[28] На ФИГ. 5А показана линейность измеренной концентрации мАт1 в сыворотке при нормализации по внутреннему стандарту в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[29] На ФИГ. 5В показана вставка к ФИГ. 5А, иллюстрирующая линейность измеренной концентрации мАт1 при низких концентрациях в сыворотке в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[30] На ФИГ. 5С показана вставка к ФИГ. 5В, иллюстрирующая линейность измеренной концентрации мАт1 при низких концентрациях в сыворотке в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[31] На ФИГ. 6А показана линейность измеренной концентрации мАт1 в сыворотке без нормализации по внутреннему стандарту в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[32] На ФИГ. 6В показана вставка к ФИГ. 6А, иллюстрирующая линейность измеренной концентрации мАт1 при низких концентрациях в сыворотке в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[33] На ФИГ. 6С показана вставка к ФИГ. 6В, иллюстрирующая линейность измеренной концентрации мАт1 при низких концентрациях в сыворотке в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[34] На ФИГ. 7А показан предел чувствительности (LOD) мАт1 в сыворотке в масс-спектре в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[35] На ФИГ. 7В показан предел количественного определения (LOQ) мАт1 в сыворотке в масс-спектре в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[36] Терапевтические пептиды или белки могут становиться гетерогенными из-за различных посттрансляционных модификаций (ПМТ), разложения белка, ферментативных модификаций и химических модификаций, которые могут быть введены в любой момент во время или после получения и очистки пептидов или белков. Идентификация и определение характеристик гетерогенных вариантов критически важны для контроля признаков качества биофизических характеристик биофармацевтических продуктов. В биофармацевтической промышленности существует нужда в быстрых высокочувствительных способах анализа с высокой пропускной способностью для управления и наблюдения за получением и очисткой терапевтических пептидов или белков, такого как получение моноклональных антител или продуктов конъюгации антитела и лекарственного средства.

[37] Обработка терапевтического пептида или белка *in vivo* после введения дополнительно определяет такие характеристики, как эффективность и безопасность терапевтического средства. Такие свойства, как фармакокинетика (ФК) и фармакодинамика (ФД) пептида или белка, могут стать очевидными только после введения. Кроме того, модификации терапевтического пептида или белка можно по-прежнему вносить *in vivo*, что приводит к образованию продуктов биотрансформации, которые невозможно прогнозировать во время производства. Таким образом, чтобы полностью понять важные показатели терапевтического средства, можно проанализировать биологические образцы, что представляет собой повышенную сложность и проблемы для чувствительного и специфического определения характеристик и количественного определения представляющего интерес белка или пептида.

[38] Анализ интактных белков на основе масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ИЭР МС) стал важным инструментом для определения

характеристик терапевтических белков во время разработки. Чаще всего МС сочетают с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (RPLC) в денатурирующих условиях. Однако чувствительность этого способа и соотношение сигнал/шум, создаваемое полученным комплексным образцом с широким диапазоном состояний заряда анализируемого вещества, имеют пределы, которые могут сделать его ненадежным для точного количественного определения антител с низким содержанием.

[39] Недавно были описаны системы ЖХ-МС, включающие нативную ионообменную хроматографию, соединенную онлайн с ИЭР МС (Yan *et al.*, 2020, *J Am Soc Mass Spectrom*, 31:2171-2179). Использование нативной хроматографии с сильным катионным обменом (SCX)-МС обеспечивает ряд преимуществ для анализа терапевтических антител по сравнению с традиционной денатурирующей RPLC-МС. Нативная SCX-МС может демонстрировать высокую чувствительность и широкий динамический диапазон по сравнению с RPLC, а также превосходную способность отделять целевое анализируемое вещество от матрицы, такое как, например, сывороточные белки в образце сыворотки. Профиль нативной SCX-МС также может иметь превосходное пространственное разрешение МС, что упрощает обнаружение вариантов белка или продуктов биотрансформации.

[40] Как описано выше, существует потребность в чувствительных способах определения характеристик и количественного определения терапевтических белков и пептидов, таких как терапевтические антитела, в образце. В данном описании изложен новый способ нативной SCX-МС для определения характеристик антитела, подходящий для разработки терапевтических антител.

[41] Если не указано иное, все технические и научные термины в контексте настоящего документа имеют значения, являющиеся общепринятыми для рядовых специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании, сейчас описаны конкретные способы и материалы.

[42] Форму единственного числа следует понимать как означающую «по меньшей мере один», а термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают специалисты в данной области техники, и при этом указаны диапазоны, включены конечные точки. В контексте настоящего документа термины «включать», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера и понимаются как означающие «содержать», «содержит» и «содержащий» соответственно.

[43] В контексте настоящего документа термин «белок» или «белок, представляющий интерес» может включать любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или более цепей полимеров аминокислот, обычно известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков,

родственных структурных вариантов природного происхождения и их синтетических аналогов неприродного происхождения, связанных посредством пептидных связей. «Синтетический пептид или полипептид» относится к пептиду или полипептиду неприродного происхождения. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные способы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или более полипептидов для образования одной функционирующей биомолекулы. В еще одном типовом аспекте белок может включать в себя фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т. п. Представляющие интерес белки могут включать в себя любые биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие Fc-слитые белки химерного рецептора, химерные белки, антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, антитела человека и биспецифические антитела. Белки могут быть получены с использованием рекомбинантных клеточных систем продуцирования, таких как бакуловирусная система на основе клеток насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*), системы на основе клеток млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор, посвященный биотерапевтическим белкам и их получению, см. в Ghaderi et al., «Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation» (Darius Ghaderi et al., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147-176 (2012), все идеи которого включены в данный документ). В некоторых типовых вариантах реализации изобретения белки включают в себя модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Эти модификации, аддукты и фрагменты включают в себя, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, FLAG-маркер, мальтозосвязывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), мус-эпитоп глутатион-S-трансферазы (GST), флуоресцентные метки и другие красители и т. п. Белки можно классифицировать на основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать в себя простые белки, такие как глобулярные белки и волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

[44] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения представляющий интерес белок может представлять собой рекомбинантный белок, антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок, scFv и их комбинации.

[45] В контексте настоящего документа термин «рекомбинантный белок»

относится к белку, полученному в результате транскрипции и трансляции гена, переносимого рекомбинантным вектором экспрессии, который был введен в подходящую клетку-хозяина. В определенных типовых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может представлять собой антитело, например, химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело. В определенных типовых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может представлять собой антитело изотипа, выбранного из группы, состоящей из: IgG, IgM, IgA1, IgA2, IgD или IgE. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения молекула антитела представляет собой полноразмерное антитело (например, IgG1) или в альтернативном варианте антитело может представлять собой фрагмент (например, Fc-фрагмент или Fab-фрагмент).

[46] Термин «антитело» в контексте настоящего документа включает в себя молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах реализации настоящего изобретения FR антитела к big-ET-1 (или его антигенсвязывающий участок) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Термин «антитело» в контексте настоящего документа также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины «антигенсвязывающий участок» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п. в контексте настоящего документа включают в себя любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или методов рекомбинантной генной инженерии, включающие проведение манипуляций и экспрессии ДНК, кодирующей переменные и,



необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или является легкодоступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и проводить с ней манипуляции химическим путем или с использованием методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

[47] В контексте настоящего документа термин «фрагмент антитела» включает в себя часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают в себя, без ограничения, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub> (или «Fab<sub>2</sub>») фрагмент, Fc-фрагмент, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, dsFv-диатело, dAb-фрагмент, Fd'-фрагмент, Fd-фрагмент и выделенную определяющую комплементарную область (CDR), а также триатела, тетраатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Fv-фрагменты представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены с помощью пептидного линкера. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, и который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых типовых вариантах реализации, фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сопоставимой с аффинностью исходного антитела, и/или конкурирует с исходным антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела может быть получен любыми средствами. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем посредством фрагментации интактного антитела, и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела можно получить путем расщепления расщепляющим ферментом IdeS или его вариантом. В альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. В альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, с помощью дисульфидных связей. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот, и более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

[48] Термин «биспецифическое антитело» включает в себя антитело, способное

избирательно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь специфически связывается с другим эпитопом - либо с двумя разными молекулами (например, антигенами), либо с одной и той же молекулой (например, с одним и тем же антигеном). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), то аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет на по меньшей мере один-два, или три, или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или на разных мишенях (например, на одном и том же или на разных белках). Биспецифические антитела можно получить, например, путем объединения тяжелых цепей, распознающих разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

[49] Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3, а также легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может связываться с каждой тяжелой цепью, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или несколько эпитопов, связанных с антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание одного или обоих из тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. Биспецифические антитела (бсАт) можно разделить на два основных класса: те, которые несут Fc-область (IgG-подобные), и те, у которых отсутствует Fc-область, при этом последние обычно имеют меньший размер, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные бсАт могут иметь различные форматы, такие как, без ограничения, триомаб, IgG с выступами во впадинах (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, Ig с двумя переменными доменами (DVD-Ig), Fab «два в одном» или двойного действия (DAF), IgG-одноцепочечные Fv (IgG-scFv) или κλ-тела. Различные форматы, не подобные IgG, включают в себя тандемные scFv, формат диател, одноцепочечные диатела, тандемные диатела (TandAbs), переориентирующуюся молекулу с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, нанотела или антитела, продуцируемые способом присоединения и блокирования (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265-310 (2014), the entire teachings of which are herein incorporated). Способы получения бсАт не ограничиваются квадратной технологией, основанной на соматическом слиянии двух

различных клеточных линий гибридомы, химической конъюгации, включающей химические сшивающие агенты, и генетическими подходами, использующими технологию рекомбинантной ДНК. Примеры бсАт включают в себя те, которые раскрыты в следующих патентных заявках, которые включены в данный документ посредством ссылки: заявке на патент США № 12/823838, поданной 25 июня 2010 г.; заявке на патент США № 13/488628, поданной 05 июня 2012 г.; заявке на патент США № 14/031075, поданной 19 сентября 2013 г.; заявке на патент США № 14/808171, поданной 24 июля 2015 г.; заявке на патент США № 15/713574, поданной 22 сентября 2017 г.; заявке на патент США № 15/713569, поданной 22 сентября 2017 г.; заявке на патент США № 15/386453, поданной 21 декабря 2016 г.; заявке на патент США № 15/386443, поданной 21 декабря 2016 г.; заявке на патент США № 15/22343, поданной 29 июля 2016 г.; и заявке на патент США № 15814095, поданной 15 ноября 2017 г.

[50] В контексте настоящего документа термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, характеризующемуся специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными антигенами. Хотя такие молекулы обычно связывают только два антигена (т. е., биспецифические антитела, бсАт), антитела с дополнительными специфичностями, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИТ, также могут быть обработаны с помощью системы и способа, раскрытых в данном документе.

[51] В контексте настоящего документа термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью технологии гибридомы. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любым доступным или известным в данной области техники способом. Моноклональные антитела, подходящие для целей настоящего изобретения, могут быть получены с использованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, в том числе использование технологий гибридомы, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

[52] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения представляющий интерес белок может быть получен из клеток млекопитающих. Клетки млекопитающих могут иметь человеческое или отличное от человеческого происхождение и могут включать в себя первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, эпителиальные клетки шейки матки, бронхиальные эпителиальные клетки, эпителиальные клетки трахеи, эпителиальные клетки почек и эпителиальные клетки сетчатки), подтвержденные клеточные линии и их штаммы (например, эмбриональные клетки почки 293, клетки ВНК, клетки эпителия шейки матки HeLa и клетки сетчатки PER-C6, клетки MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки CHO, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Hep-2, клетки KB, клетки LSI80, клетки LS174T, клетки NCI-H-548, клетки RPMI2650, клетки SW-13, клетки T24, клетки WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-1, клетки LLC-MK2, клетки клона M-3, клетки 1-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки

LLC-PKi, клетки PK(15), клетки GH<sub>i</sub>, клетки GH<sub>3</sub>, клетки L<sub>2</sub>, клетки LLC-RC 256, клетки MH<sub>i</sub>C<sub>i</sub>, клетки XC, клетки MDOK, клетки VSW и TH-I, клетки B<sub>1</sub>, клетки BSC-1, клетки RAf, клетки RK, клетки PK-15 или их производные), клетки фибробластов из любой ткани или органа (в том числе, без ограничения, сердца, печени, почек, толстой кишки, кишечника, пищевода, желудка, нервной ткани (головной мозг, спинной мозг), легких, сосудистой ткани (артерии, вены, капилляры), лимфоидной ткани (лимфатические железы, аденоиды, миндалины, костный мозг и кровь), селезенки, а также фибробласты и фибробластоподобные клеточные линии (например, клетки CHO, клетки TRG-2, клетки IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки, характерные для цитруллинемии, клетки Dempsey, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, клетки HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки Midi, клетки CHO, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки Vero, клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T<sub>3</sub>, клетки F9, клетки SV-T<sub>2</sub>, клетки M-MSV-BALB/3T<sub>3</sub>, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C3H/IOTI/2, клетки HSDMiC<sub>3</sub>, клетки KLN205, клетки McCoy, L-клетки мыши, клетки штамма 2071 (L-клетки мыши), клетки штамма L-M (L-клетки мыши), клетки L-MTK' (L-клетки мыши), клетки клонов NCTC 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1, клетки Swiss/3T<sub>3</sub>, клетки индийского мунджака, клетки SIRC, клетки C<sub>n</sub> и клетки Jensen, Sp2/0, NS0, клетки NS1 или их производные).

[53] В контексте настоящего документа термин «образец» может быть получен на любой стадии биопроцесса, например, из жидкости культуры клеток (CCF), жидкости собранной культуры клеток (HCCF), любой обработки ниже по технологической цепочке, лекарственного вещества (DS) или лекарственного препарата (DP), содержащего конечный составленный продукт. В некоторых других конкретных типовых вариантах реализации изобретения образец может быть выбран на любой стадии ниже по технологической цепочке процесса очистки, хроматографического получения, инактивации вирусов или фильтрации. В некоторых конкретных типовых вариантах реализации изобретения лекарственный препарат может быть выбран из произведенного лекарственного препарата в клинике, при отгрузке, хранении или обращении.

[54] Образец также может быть взят у субъекта до и/или после введения терапевтического пептида или белка, и в этом случае он может представлять собой «биологический образец» или «ФК-образец». Биологический образец может представлять собой, например, образец ткани, образец крови, образец сыворотки, образец слюны или образец мочи. В одном типовом варианте реализации изобретения у субъекта берут образец сыворотки для определения характеристик и/или количественного определения представляющего интерес белка после введения. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения биологический образец берут у мыши.

[55] В контексте настоящего документа термин «примесь» может включать в себя любой нежелательный белок, присутствующий в белковом биофармацевтическом препарате. Примесь может включать в себя примеси, связанные со способом и с

продуктом. Кроме того, примесь может иметь известную структуру, быть частично охарактеризованной или неидентифицированной. Примеси, связанные со способом, могут быть получены в способе получения и могут включать в себя три основные категории: полученные из клеточного субстрата, полученные из культуры клеток и полученные ниже по технологической цепочке. Примеси, полученные из клеточного субстрата, включают в себя, без ограничения, белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную из клеток хозяина, векторную или общую ДНК). Примеси, полученные из культуры клеток, включают в себя, без ограничения, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, полученные ниже по технологической цепочке, включают в себя, без ограничения, ферменты, реагенты для химической и биохимической обработки (например, цианогенбромид, гуанидин, окисляющие и восстанавливающие реагенты), неорганические соли (например, тяжелых металлов, мышьяка, неметаллического иона), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие выщелачиваемые вещества. Примеси, связанные с продуктом (например, предшественники, некоторые продукты разложения), могут представлять собой молекулярные варианты, возникающие при получении и/или хранении, которые не обладают свойствами, сравнимыми со свойствами требуемого продукта, в отношении активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут требовать существенных усилий для выделения и характеристики с целью определения типа модификации(-й). Примеси, связанные с продуктом, могут включать в себя усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются под действием гидролитических ферментов или химических реагентов, катализирующих расщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают в себя, без ограничения, дезамидированные, изомеризованные, с неправильно образованными связями S-S, окисленные или измененные сопряженные формы (например, гликозилирование, фосфорилирование). Модифицированные формы могут также включать в себя любую форму посттрансляционной модификации. Агрегаты включают в себя димеры и более высокие повторения требуемого продукта. (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept. of Health and Humans Services).

[56] В контексте настоящего документа общий термин «посттрансляционные модификации» или «ПТМ» относится к ковалентным модификациям, которым подвергаются полипептиды, как во время (котрансляционная модификация), так и после (посттрансляционная модификация) их рибосомного синтеза. ПТМ в целом вводят при помощи специфических ферментов или ферментативных путей. Множество их происходит в месте специфической характеристической белковой последовательности (сигнатурная последовательность) в главной цепи белка. Было зарегистрировано несколько сотен ПТМ, и указанные модификации неизменно оказывают влияние на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. «Proteins» (2014) second edition, published by Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные

посттрансляционные модификации включают в себя, без ограничения, отщепление, N-концевые удлинения, разложение белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование фрагментов лизина биотином), амидирование C-конца, гликозилирование, иодирование, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование (присоединение ацетильной группы, обычно на N-конце белка), алкилирование (присоединение алкильной группы (например, метил, этил, пропил), обычно на остатках лизина или аргинина), метилирование, аденилирование, АДФ-рибозилирование, ковалентные поперечные связи внутри полипептидной цепи или между цепями, сульфонирование, пренилирование, витамин С-зависимые модификации (гидроксилирование пролина и лизина и амидирование карбокси-конца), витамин К-зависимая модификация, при которой витамин К представляет собой кофактор карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты, приводящего к образованию  $\gamma$ -карбоксиглутамата (остаток glu), глутамилирование (ковалентное присоединение остатков глутаминовой кислоты), глицилирование (ковалентное присоединение остатков глицина), гликозилирование (присоединение гликозильной группы к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, приводящее к образованию гликопротеина), изопренилирование (присоединение изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липолирование (присоединение функциональной группы липоата), фосфопантетеинилирование (присоединение остатка 4'-фосфопантетеинила из кофермента А, как в биосинтезе жирной кислоты, поликетиды, нерибосомного пептида и лейцина), фосфорилирование (присоединение фосфатной группы, обычно к серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфирование (присоединение сульфатной группы, обычно к остатку тирозина). Посттрансляционные модификации, изменяющие химическую природу аминокислот, включают, без ограничения, цитруллинирование (превращение аргинина в цитруллин путем дезиминирования) и дезамидирование (превращение глутамин в глутаминовую кислоту или аспарагина в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, включающие структурные изменения, включают в себя, без ограничения, образование дисульфидных мостиков (ковалентных связей между двумя аминокислотами цистеина) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). Некоторые посттрансляционные модификации включают в себя присоединение других белков или пептидов, такие как ISGилирование (ковалентное присоединение белка ISG15 (ген, стимулированный интерфероном)), SUMOилирование (ковалентное присоединение белка SUMO (малый убиквитин-подобный модификатор)) и убиквитинирование (ковалентное присоединение белка убиквитина). См. источник информации European Bioinformatics Institute Protein Information ResourceSIB Swiss Institute of Bioinformatics, European Bioinformatics Institute Drs - Drosomycin precursor - *Drosophila melanogaster* (Fruit fly) - Drs gene & protein, <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> (последнее посещение 15 января 2019 г.) для более подробного контролируемого перечня ПТМ по рекомендациям UniProt.

[57] Посттрансляционные модификации, варианты заряда или варианты размера

терапевтического пептида или белка могут возникнуть в любой момент во время производства, изготовления, хранения, доставки или введения терапевтического пептида или белка. Дополнительные модификации пептида или белка могут возникать *in vivo* после введения субъекту в процессе, называемом «биотрансформацией». Продукты биотрансформации могут иметь модифицированные свойства по сравнению с терапевтическими препаратами для предварительного введения. Биотрансформация часто приводит к уменьшению размера терапевтического препарата, поэтому предпочтительными могут быть способы обнаружения с более высокой чувствительностью к меньшим анализируемым веществам. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения способ по настоящему изобретению обладает высокой чувствительностью к продуктам биотрансформации представляющего интерес белка.

[58] В некоторых типовых вариантах реализации способ определения характеристик и/или количественного определения представляющего интерес белка может необязательно включать в себя насыщение представляющего интерес белка в матрице образца с использованием иммунопреципитации (IP). В контексте настоящего документа термин «иммунопреципитация» может включать в себя процесс преципитации белкового антигена из раствора с использованием антитела, которое специфически связывается с этим конкретным белком. Иммунопреципитация может быть прямой, при которой антитела к белку-мишени иммобилизуются на твердофазном субстрате, или непрямой, при которой нормальные антитела добавляются к белковой смеси с последующим захватом, например, с помощью гранул белка A/G.

[59] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения твердофазный субстрат может представлять собой гранулы, например агарозные гранулы или магнитные гранулы. Гранулы могут быть покрыты стрептавидином для облегчения прикрепления к антителу. Затем биотинилированное «захваченное» антитело может быть приведено в контакт с гранулами, покрытыми стрептавидином, прикрепляясь к гранулам и образуя «гранулы для иммунопреципитации», способные связываться с антигеном прикрепленного антитела. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения прикрепленное захваченное антитело может представлять собой антитело к Fc и, в частности, может представлять собой антитело к Fc человека.

[60] Антитело к Fc человека будет предпочтительно связываться с Fc-доменом любого антитела человека, такого как, например, терапевтическое антитело, и, таким образом, его можно использовать для иммунопреципитации или «вытягивания» терапевтического антитела из образца, позволяя насыщать его для анализа. После иммунопреципитации терапевтического антитела расщепляющий фермент можно ввести в контакт со смесью для иммунопреципитации, чтобы расщепить терапевтическое антитело и высвободить фрагменты антитела, которые затем можно элюировать для дальнейшего анализа. В одном типовом варианте реализации изобретения IdeS или его варианты используют в качестве расщепляющего фермента. Расщепление IdeS дает два фрагмента антитела: Fc-фрагмент и Fab<sub>2</sub>-фрагмент. Когда Fc-домен терапевтического антитела

связывается с захваченным антителом к Fc человека, расщепление с помощью IdeS приведет к высвобождению несвязанного Fab<sub>2</sub>-фрагмента, который затем можно элюировать для дальнейшего анализа. В одном типовом варианте реализации изобретения элюированные Fab<sub>2</sub>-фрагменты подвергаются анализу жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией, в частности нативной SCX-МС.

[61] В контексте настоящего документа термин «расщепление» относится к гидролизу одной или более пептидных связей белка. Существует несколько подходов к проведению расщепления белка в образце с помощью пригодного гидролизующего агента, например, ферментативное расщепление или неферментативное расщепление.

[62] В контексте настоящего документа термин «расщепляющий фермент» относится к любому из большого числа различных агентов, которые могут осуществлять расщепление белка. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают в себя протеазу из *Aspergillus Saitoi*, эластазу, субтилизин, протеазу XIII, пепсин, трипсин, трип-N, химо трипсин, аспергиллопепсин I, протеазу LysN (Lys-N), эндопротеиназу LysC (Lys-C), эндопротеиназу Asp-N (Asp-N), эндопротеиназу Arg-C (Arg-C), эндопротеиназу Glu-C (Glu-C) или белок наружной мембраны T (OmpT), иммуноглобулин-деградирующий фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), термолизин, папаин, проназу, протеазу V8 или их биологически активные фрагменты или гомологи или их комбинации. Недавний обзор, в котором обсуждаются доступные способы для расщепления белка, см. в публикации Switzar et al., «Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments» (Linda Switzar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments, 12 JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH 1067-1077 (2013)).

[63] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения IdeS или его вариант используют для расщепления антитела ниже шарнирной области с получением Fc-фрагмента и Fab<sub>2</sub>-фрагмента. Расщепление анализируемого вещества может быть преимущественным, поскольку уменьшение размера может повысить чувствительность и специфичность определения характеристик и обнаружения анализируемого вещества с помощью ЖХ-МС. При использовании для этой цели может быть предпочтительным расщепление, при котором выделяется Fc-фрагмент и сохраняется Fab<sub>2</sub>-фрагмент для анализа. Это связано с тем, что представляющие интерес переменные области, такие как определяющая комплементарность область (CDR) антитела, содержатся в Fab<sub>2</sub>-фрагменте, тогда как Fc-фрагмент может быть относительно однородным между антителами и, таким образом, предоставлять менее релевантную информацию. Кроме того, расщепление IdeS имеет высокую эффективность, обеспечивая высокое извлечение анализируемого вещества. Процесс расщепления и элюирования можно проводить в нативных условиях, что обеспечивает простое соединение с системой нативной ЖХ-МС.

[64] IdeS или его варианты имеются в продаже и могут продаваться, например, как FabRICATOR<sup>®</sup> или FabRICATOR Z<sup>®</sup>.



[65] В контексте настоящего документа термин «жидкостная хроматография» относится к процессу, в котором биологическая/химическая смесь, переносимая жидкостью, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального разделения компонентов при их протекании насквозь или внутрь стационарной жидкости или твердой фазы. Неограничивающие примеры жидкостной хроматографии включают в себя обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия или хроматографию смешанного режима.

[66] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения способ определения характеристик и/или количественного определения представляющего интерес белка может включать в себя использование хроматографии с сильным катионным обменом (SCX). Катионообменная хроматография представляет собой разновидность ионообменной хроматографии, в которой используют неподвижную фазу, представляющую отрицательно заряженную функциональную группу, для захвата положительно заряженных анализируемых веществ. pH хроматографического буфера можно постепенно регулировать для высвобождения и элюирования анализируемых веществ в порядке pI.

[67] В катионообменной хроматографии используют «материал для катионообменной хроматографии». Катионообменную хроматографию можно дополнительно подразделить, например, на хроматографию с сильным катионным обменом (SCX) или слабым катионным обменом, в зависимости от используемого материала для катионообменной хроматографии. Материалы для катионообменной хроматографии с сульфокислой группой (S) можно использовать в устройствах с сильным катионным обменом, тогда как материалы для катионообменной хроматографии с карбоксиметильной группой (CM) можно использовать в устройствах со слабым катионным обменом. Устройства с сильным катионным обменом включают в себя, например, SOURCE S, в котором используют функциональную группу метилсульфата, и SP Sepharose, в котором используют функциональную группу сульфопропила. Устройства со слабым катионным обменом включают в себя, например, CM-целлюлозу, в которой используют функциональную группу карбоксиметила. SCX может быть предпочтительным, поскольку можно использовать более широкий диапазон pH-буферов без потери заряда устройства с сильным катионным обменом, что обеспечивает эффективное отделение анализируемых веществ с широким диапазоном pI.

[68] Материалы для катионообменной хроматографии поставляются под разными названиями множеством компаний, такими как, например, Bio-Rex, Macro-Prep CM (доступен от BioRad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США), слабый катионообменник WCX 2 (доступен от Ciphergen, Фремонт, Калифорния, США), Dowex MAC-3 (доступен от Dow chemical company, Мидленд, Мичиган, США), Mustang C (доступен от Pall Corporation, Ист-Хиллз, Нью-Йорк, США), целлюлоза CM-23, CM-32, CM-52, hyper-D и

партисфера (доступны от Whatman plc, Brentford, Соединенное Королевство), Amberlite IRC 76, IRC 747, IRC 748, GT 73 (доступны от Tosoh Bioscience GmbH, Штутгарт, Германия), CM 1500, CM 3000 (доступны от BioChrom Labs, Terre-Hot, Индиана, США) и CM-Sepharose Fast Flow (доступен от GE Healthcare, Life Sciences, Германия). Кроме того, имеющиеся в продаже катионообменные смолы дополнительно включают в себя карбоксиметилцеллюлозу, Bakerbond ABX, сульфопропил (SP), иммобилизованный на агарозе (например, SP-Sepharose Fast Flow или SP-Sepharose High Performance, доступные от GE Healthcare - Amersham Biosciences Europe GmbH, Фрайбург, Германия) и сульфонил, иммобилизованный на агарозе (например, S-Sepharose Fast Flow, доступный от GE Healthcare, Life Sciences, Германия).

[69] Материалы для катионообменной хроматографии включают в себя материалы для хроматографии смешанного режима, сочетающие в себе технологии ионного обмена и гидрофобного взаимодействия (например, Capto adhere, Capto MMC, MEP HyperCell, Eshmuno HСХ и т. д.), материалы для хроматографии смешанного режима, сочетающие в себе анионообменные и катионообменные технологии (например, гидроксипатит, керамический гидроксипатит и т. д.) и т. п. Материалы для катионообменной хроматографии, которые можно использовать в катионообменной хроматографии в настоящем изобретении, могут включать в себя, без ограничения, все имеющиеся в продаже материалы для катионообменной хроматографии, как описано выше.

[70] Хотя денатурирующая RPLC-МС представляет собой традиционный метод определения характеристик терапевтических белков, нативная SCX-МС может обеспечивать аналитические преимущества, как описано в настоящем документе. Например, нативная SCX-МС может обеспечивать улучшенную чувствительность и специфичность обнаружения. В случаях, когда пределы чувствительности RPLC и SCX сопоставимы, SCX может обеспечивать превосходное качество данных и более высокое соотношение сигнал/шум. SCX может иметь улучшенную способность отделять анализируемое вещество-мишень от матричных белков, например, сывороточных белков в образце сыворотки, и, кроме того, может иметь улучшенную способность разделять продукты биотрансформации представляющего интерес белка. Таким образом, предпочтительная хроматография для способа по настоящему изобретению представляет собой нативную SCX, и в настоящем документе раскрыт новый способ определения характеристик и/или количественного определения представляющего интерес белка с использованием нативной SCX.

[71] В контексте настоящего документа термин «масс-спектрометр» включает в себя устройство, способное идентифицировать конкретные виды молекул и измерять их точные массы. Подразумевается, что термин включает в себя любой молекулярный детектор, в который может быть элюирован полипептид или пептид для характеристики. Масс-спектрометр может включать в себя три основных части: источник ионов, массовый анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры определяемого вещества могут переноситься в

газовую фазу и ионизированы одновременно (как в ионизации электрораспылением) или посредством отдельных способов. Выбор источника ионов зависит от области применения. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр. В контексте настоящего документа термин «тандемная масс-спектрометрия» включает в себя метод, при котором структурную информацию о молекулах образца получают с использованием нескольких стадий массового отбора и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что молекулы пробы должны быть переведены в газовую фазу и ионизированы таким образом, чтобы фрагменты образовывались прогнозируемым и контролируемым образом после первого этапа массового отбора. Многостадийную МС/МС, или МС<sup>n</sup>, можно выполнять путем сначала выбора и выделения иона-предшественника (МС<sup>2</sup>), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона (МС<sup>3</sup>), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (МС<sup>4</sup>) и т. д. до тех пор, пока можно получить значимую информацию или можно обнаружить сигнал фрагментного иона. Тандемную МС успешно выполняли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализаторов для комбинаций в конкретных применениях может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Двумя основными категориями способов тандемной МС являются «тандем в пространстве» и «тандем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «тандем во времени» сопряжены в пространстве или с анализаторами «тандем в пространстве». Масс-спектрометр «тандем в пространстве» включает источник ионов, устройство активации ионов-предшественников и по меньшей мере два не-захватных масс-анализатора. Конкретные функции  $m/z$  разделения могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной секции прибора ионы выбирали, диссоциировали в промежуточной области, а ионы продукта затем передавали в другой анализатор для  $m/z$  разделения и сбора данных. В масс-спектрометре «тандем во времени» ионы, образующиеся в источнике ионов, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по  $m/z$  в одном и том же физическом устройстве. Выявленные масс-спектрометром пептиды могут применяться в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно применять для определения характеристик белков путем сопоставления экспериментальных и теоретических данных МС/МС, при этом последние генерируются по возможным пептидам в базе данных белковых последовательностей. Указанное определение характеристик включает в себя, без ограничения, секвенирование аминокислот фрагментов белка, определение секвенирования белка, определение секвенирования белка *de novo*, определение локализации посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

[72] В некоторых типовых аспектах масс-спектрометр может работать с использованием наноэлектрораспыления или нанораспыления.

[73] Термин «нанозлектрораспыление» или «нанораспыление» в контексте настоящего документа относится к ионизации электрораспылением при очень низкой скорости потока растворителя, обычно сотни нанолитров в минуту раствора образца или ниже, часто без использования внешней подачи растворителя. В установке нагнетания электрораспыления, создающих нанозлектрораспыление, можно применять статический генератор нанозлектрораспыления или динамический генератор нанозлектрораспыления. Статический генератор нанозлектрораспыления проводит непрерывный анализ небольших объемов раствора образца (анализируемого вещества) в течение длительного времени. В динамическом генераторе нанозлектрораспыления применяют капиллярную колонку и систему подачи растворителя для осуществления хроматографического разделения смесей перед анализом на масс-спектрометре.

[74] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения SCX-МС можно выполнять в нативных условиях.

[75] В контексте настоящего документа термин «нативные условия» может включать в себя выполнение масс-спектрометрии в условиях, которые сохраняют нековалентные взаимодействия в анализируемом веществе. Нативная масс-спектрометрия представляет собой подход к изучению интактной биомолекулярной структуры в неденатурированном или близком к неденатурированному состоянию. Термин «нативный» относится к биологическому состоянию анализируемого вещества в растворе перед воздействием ионизации. Некоторые параметры раствора, содержащие биологические анализируемые вещества, такие как рН и ионная сила, можно контролировать для поддержания неденатурированного состояния сворачивания биологических анализируемых соединений в растворе. В целом, нативная масс-спектрометрия основана на ионизации электрораспылением, при котором биологические анализируемые соединения распыляют из неденатурирующего растворителя. Другие термины, такие как нековалентная, с нативным распылением, с ионизацией электрораспылением, неденатурирующая, макромолекулярная или сурамолекулярная масс-спектрометрия, также можно применять для описания нативной масс-спектрометрии. В типовых вариантах реализации изобретения нативная МС обеспечивает лучшее пространственное разрешение по сравнению с ненативной МС, улучшая обнаружение продуктов биотрансформации терапевтического белка. Для подробного обзора нативной масс-спектрометрии следует обратиться к обзору: Elisabetta Boeri Erba & Carlo Petosa, The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes, 24 PROTEIN SCIENCE 1176-1192 (2015).

[76] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения SCX-МС можно выполнять в ненативных условиях. Представляющий интерес пептид или белок можно получить, например, путем алкилирования, восстановления, денатурации и/или расщепления.

[77] В контексте настоящего документа термин «агент, алкилирующий белок» относится к агенту, используемому для алкилирования определенных свободных

аминокислотных остатков в белке. Неограничивающие примеры агентов, алкилирующих белок, представляют собой йодацетамид (IOA), хлорацетамид (CAA), акриламид (AA), N-этилmaleимид (NEM), метилметантиосульфат (MMTS) и 4-винилпиридин или их комбинации.

[78] В контексте настоящего документа термин «денатурация белка» может относиться к процессу, в котором трехмерная форма молекулы изменяется по сравнению с ее нативным состоянием. Денатурацию белка можно осуществлять с использованием агента, денатурирующего белок. Неограничивающие примеры агента, денатурирующего белок, включают в себя нагревание, высокий или низкий pH, восстанавливающие агенты, такие как ДТТ (см. ниже), или воздействие хаотропных агентов. Некоторые хаотропные агенты можно использовать в качестве агентов, денатурирующих белок. Хаотропные растворенные вещества повышают энтропию системы посредством препятствования внутримолекулярным взаимодействиям, опосредованным нековалентными силами, такими как водородные связи, ван-дер-ваальсовы силы и гидрофобные эффекты. Неограничивающие примеры хаотропных агентов включают в себя бутанол, этанол, хлорид гуанидиния, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину, N-лауроилсаркозин, мочевины и их соли.

[79] В контексте настоящего документа термин «агент, восстанавливающий белок» относится к агенту, используемому для восстановления дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающие примеры восстановительных агентов белка, используемых для восстановления белка, представляют собой дитиотреитол (ДТТ),  $\beta$ -меркаптоэтанол, реактив Элмана, гидрохлорид гидроксиламина, цианоборгидрид натрия, трис(2-карбоксиэтил)фосфингидрохлорид (ТСЕР-HCl) или их комбинации.

[80] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр.

[81] В контексте настоящего документа термин «тандемная масс-спектрометрия» включает в себя метод, при котором структурную информацию о молекулах образца получают с использованием нескольких стадий массового отбора и разделения изотопов. Необходимым условием является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в интактном состоянии, и что можно индуцировать их распад некоторым прогнозируемым и контролируемым образом после первой стадии селекции по массе. Многостадийную МС/МС, или МС<sup>n</sup>, можно выполнять путем сначала выбора и выделения иона-предшественника (МС<sup>2</sup>), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона (МС<sup>3</sup>), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (МС<sup>4</sup>) и т. д. до тех пор, пока можно получить значимую информацию или можно обнаружить сигнал фрагментного иона. Тандемную МС успешно выполняли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализатора для конкретного применения может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Двумя основными категориями способов тандемной МС являются «тандем в

пространстве» и «тандем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «тандем во времени» сопряжены в пространстве или с анализаторами «тандем в пространстве». Масс-спектрометр «тандем в пространстве» включает источник ионов, устройство активации ионов-предшественников и по меньшей мере два незахватных масс-анализатора. Конкретные функции разделения  $m/z$  могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной секции прибора происходила селекция ионов, затем диссоциация в промежуточной области и передача ионов продукта в другой анализатор для разделения по  $m/z$  и сбора данных. В масс-спектрометре «тандем во времени» ионы, образующиеся в ионном источнике, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по  $m/z$  в одном и том же физическом устройстве.

[82] Выявленные масс-спектрометром пептиды могут применяться в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно применять для определения характеристик белков путем сопоставления экспериментальных и теоретических данных МС/МС, при этом последние генерируются по возможным пептидам в базе данных белковых последовательностей. Указанное определение характеристик включает в себя, без ограничения, секвенирование аминокислот фрагментов белка, определение секвенирования белка, определение секвенирования белка *de novo*, определение локализации посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

[83] В контексте настоящего документа термин «база данных» относится к скомпилированному набору белковых последовательностей, которые могут существовать в образце, например, в виде файла в формате FASTA. Соответствующие белковые последовательности могут быть получены из последовательностей кДНК изучаемого вида. Общедоступные базы данных, которые можно использовать для поиска релевантных белковых последовательностей, включают в себя базы данных, организованные, например, Uniprot или Swiss-prot. Поиск в базах данных может осуществляться с использованием того, что в дальнейшем называется «инструментами биоинформатики». Инструменты биоинформатики обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров МС/МС по всем возможным последовательностям в базе данных (базах данных) и предоставляют интерпретированные (аннотированные) спектры МС/МС в качестве выходных данных. Неограничивающими примерами таких инструментов являются Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), Spectrum Mill ([www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com)), PLGS ([www.waters.com](http://www.waters.com)), PEAKS ([www.bioinformaticssolutions.com](http://www.bioinformaticssolutions.com)), Proteinpilot ([download.appliedbiosystems.com/proteinpilot](http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot)), Phenyx ([www.phenyx-ms.com](http://www.phenyx-ms.com)), Sorcerer ([www.sagenresearch.com](http://www.sagenresearch.com)), OMSSA ([www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/)), X!Tandem ([www.thegpm.org/TANDEM/](http://www.thegpm.org/TANDEM/)), Protein Prospector ([prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm](http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm)), Byonic ([www.proteinmetrics.com/products/byonic](http://www.proteinmetrics.com/products/byonic)) или Sequest ([fields.scripps.edu/sequest](http://fields.scripps.edu/sequest)).

[84] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр соединен с хроматографической системой, например SCX.

[85] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр может быть соединен с жидкостной хроматографией-системой мониторинга множественных реакций. В целом, как правило, масс-спектрометр способен проводить анализ с помощью мониторинга выбранных реакций (МВР), включая мониторинг последовательных реакций (МПР) и мониторинг параллельных реакций (МПР).

[86] В контексте настоящего документа термин «мониторинг множественных реакций» или «ММР» относится к методу, основанному на масс-спектрометрии, который может точно определять количество малых молекул, пептидов и белков в сложных матрицах с высокой чувствительностью, специфичностью и широким динамическим диапазоном (Paola Picotti & Ruedi Aebersold, Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions, 9 NATURE METHODS 555-566 (2012)). ММР, как правило, можно проводить с помощью тройных квадрупольных масс-спектрометров, в которых ион-предшественник, соответствующий выбранным малым молекулам/пептидам, выбирается в первом квадруполе, а фрагмент иона-предшественника выбирается для мониторинга в третьем квадруполе (Yong Seok Choi et al., Targeted human cerebrospinal fluid proteomics for the validation of multiple Alzheimers disease biomarker candidates, 930 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 129-135 (2013)).

[87] В некоторых аспектах масс-спектрометр в способе или системе по настоящей заявке может быть масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометром с тройным квадруполем, при этом масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии, при этом масс-спектрометр способен выполнять анализы ЖХ-МС (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией) или ЖХ-ММР-МС (жидкостная хроматография-мониторинг множественных реакций-масс-спектрометрия).

[88] В контексте настоящего документа термин «масс-анализатор» включает в себя устройство, способное разделять фрагменты, то есть атомы, молекулы или кластеры, по их массе. Неограничивающие примеры масс-анализаторов, которые можно использовать, представляют собой времяпролетный (TOF), магнитный электрический секторный, квадрупольный масс-фильтр (Q), квадрупольную ионную ловушку (QIT), орбитальную ловушку, ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье (FTICR), а также метод масс-спектрометрии с ускорителем (AMS).

[89] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается чем-либо из вышеуказанного(-ых) представляющего(-их) интерес белка(-ов), антитела (антител), фрагмента(-ов) антитела, образца(-ов), примеси(-ей), ПТМ, способа(-ов) иммунопреципитации, способа(-ов) или системы (систем) жидкостной хроматографии, масс-спектрометра(-ов), алкилирующего(-их) агента(-ов), восстанавливающего(-их) агента(-ов), расщепляющего(-их) фермента(-ов), базы данных (баз данных) или инструмента(-ов) биоинформатики, и могут быть выбраны любым подходящим способом

любые представляющие интерес белок(-ки), антитело(-а), фрагмент(-ы) антитела, образец(-цы), примесь(-и), ПТМ, способ(-ы) иммунопреципитации, способ(-ы) или система(-ы) жидкостной хроматографии, масс-спектрометр(-ы), алкилирующий(-е) агент(-ы), восстанавливающий(-е) агент(-ы), расщепляющий(-е) фермент(-ы), база(-ы) данных или инструмент(-ы) биоинформатики.

[90] Настоящее изобретение будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

### **ПРИМЕРЫ**

[91] Один типовой вариант реализации способа по настоящему изобретению проиллюстрирован на ФИГ. 1. Первый показанный компонент представляет собой картридж, содержащий агарозные гранулы, конъюгированные со стрептавидиновыми фрагментами. Затем в картридж добавляют биотинилированное антитело к Fc человека и связывают его с гранулами стрептавидина с получением гранул для иммунопреципитации. Биотинилированное антитело к Fc человека можно произвести или коммерчески приобрести. Одна типовая реакция биотина-стрептавидина включает в себя инкубацию примерно при комнатной температуре в течение около 15 минут. Затем в картридж добавляют образцы, содержащие анализируемое вещество, и инкубируют для иммунопреципитации или «вытягивания» анализируемого вещества. Один типовой процесс иммунопреципитации включает в себя инкубацию примерно при комнатной температуре в течение около 1 часа. Проиллюстрированный пример представляет собой образец фармакокинетического исследования, содержащий триспецифическое антитело в качестве представляющего интерес белка и анализируемого вещества, но способ по настоящему изобретению не ограничивается этим примером и может быть применен к любому подходящему образцу, содержащему любое антитело или родственный антителу белок.

[92] Затем образец промывают для удаления неспецифически связанных компонентов. Одна типовая стадия промывания включает в себя промывание картриджа 6 объемами картриджа буфера HBS-EP (Cytiva), а затем 6 объемами картриджа Трис-HCl (10 mM, pH 7,5). Затем в картридж добавляют расщепляющий фермент, например IdeS или его вариант, и его инкубируют, что приводит к расщеплению связанного анализируемого вещества, например к отделению Fc-фрагмента от Fab<sub>2</sub>-фрагмента антитела. Одна типовая стадия расщепления включает в себя добавление 40 единиц белка IdeS FabRICATOR<sup>®</sup> (Genovis) или 1 единицы расщепляющего фермента на мкг анализируемого вещества и инкубирование при около 37°C в течение периода от около 30 минут до около 1 часа. Картридж центрифугируют («осаждают») для элюирования освобожденных Fab<sub>2</sub>-фрагментов, а элюат собирают для последующего анализа нативной SCX-МС.

[93] Типовые способы анализа нативной SCX-МС описаны в Yan *et al.*, 2020, *J Am Soc Mass Spectrom*, 31:2171-2179, который включен в настоящий документ посредством ссылки. В одном типовом варианте реализации изобретения условия SCX-МС являются



следующими. Колонка SCX представляет собой YMC BioPro IEX SF 4,6×50 мм, 5 мкм. Температура колонки составляет 45°C. Подвижная фаза А (MPA) содержит 10 mM ацетата аммония, а подвижная фаза В (MPB) содержит 300 mM ацетата аммония. Скорость потока составляет 0,4 мл/мин. Градиент составляет: 0-1 минута: 100% MPA; 1-9 минут: от 100% MPA до 100% MPB; 9-10,5 минуты: 100% MPB; 10,5-10,6 минуты: от 100% MPB до 100% MPA; и 10,6-15 минут: 100% MPA.

[94] Разрешение MS установлено на уровне 12 500 (UHMR). Напряжение капиллярного распыления установлено на уровне 3,0 кВ. Температура капилляров установлена на уровне 350°C. РЧ-уровень S-линзы установлен на уровне 200. Энергия фрагментации в источнике установлена на уровне 100. Давление улавливающего газа HCD установлено на уровне 3. Масс-спектры получены с окном диапазона  $m/z$  от 2000 до 15 000.

### **Пример 1. Выбор колонки SCX**

[95] Характеристики нескольких колонок SCX сравнивали для оптимизации способа по настоящему изобретению. Фрагменты Fab<sub>2</sub> получали, как описано выше, и подвергали анализу нативной SCX-МС. Bioresolve SCX 2,1×50 мм сравнивали с YMC SCX 4,6×50 мм. Общие ионные хроматограммы (TIC) SCX-МС для каждой колонки показаны на ФИГ. 2, на которой представлены соответствующие скорости потока и температура для каждого эксперимента. На основе продемонстрированной чувствительности способа, для дальнейших экспериментов применяли YMC SCX 4,6×50 мм с использованием 8-минутного градиента 10-300 mM буфера ацетата аммония.

### **Пример 2. Установление предела чувствительности и предела количественного определения в чистом растворе**

[96] Способ нативной SCX-МС по настоящему изобретению тестировали на Fab<sub>2</sub>-фрагментах в чистом растворе для установления предела чувствительности (LOD). Чистый раствор содержал анализируемое вещество антитела и антитело внутреннего стандарта (300 пг/мкл или 600 пг на колонке) в 10 mM трис-HCl-буфера (pH 7,5). В качестве анализируемого вещества тестировали диапазоны антител с pI в диапазоне от высокого до низкого, как показано на ФИГ. 3А. Диапазоны pI тестируемых антител составляли от 6,28 до 8,15. Количества тестируемых образцов на колонке варьировались от 20 пг до 2 мкг, а концентрация варьировалась от 10 пг/мкл до 1 мкг/мкл.

[97] Для каждого образца проводили 15-минутный анализ SCX, каждый со скоростью потока 0,2 мл/мин, за исключением Ab9. Тестируемые антитела включали в себя антитела IgG1 и IgG4, а также мАт и бсАт, представляющие собой широкое разнообразие терапевтических антител. Способ по настоящему изобретению позволял эффективно разделять и анализировать каждое антитело с высокой чувствительностью. Масс-спектры двух типовых антител в диапазоне концентраций от 20 пг до 20 нг показаны на ФИГ. 3В и 3С. Абсолютный LOD Fab<sub>2</sub>-фрагментов с использованием способа по настоящему изобретению в этих условиях был определен как 20 пг.

[98] Дополнительно оценивали LOD и предел количественного определения (LOQ)

в чистом растворе, как показано на ФИГ. 4. Fab<sub>2</sub>-фрагмент мАт1 анализировали с использованием нативной SCX-МС, причем Fab<sub>2</sub>-фрагмент мАт2 использовали в качестве внутреннего стандарта, как показано в ТИС на ФИГ. 4А. На ФИГ. 4В показано сравнение фактической концентрации мАт1 с интенсивностью, нормализованной по внутреннему стандарту, измеренной способом по настоящему изобретению, в диапазоне концентраций от 20 пг до 20 нг. Фактические и измеренные концентрации демонстрируют линейную зависимость со взвешенным R<sup>2</sup>, составляющим 0,9954, что демонстрирует способность способа по настоящему изобретению точно и чувствительно количественно определять анализируемое вещество при низких концентрациях. На ФИГ. 4С показано то же сравнение, выполненное с диапазоном концентраций от 20 нг до 2 мкг, причем сильная линейная зависимость снова продемонстрирована в этом более высоком диапазоне концентраций. Типовые масс-спектры в диапазоне от 20 пг до 2 мкг показаны на ФИГ. 4Д, дополнительно иллюстрирующей чувствительность и специфичность способа по настоящему изобретению.

### **Пример 3. Установление предела чувствительности и предела количественного определения в сыворотке**

[99] Надежность способа по настоящему изобретению была дополнительно продемонстрирована с использованием анализируемых веществ из образца сыворотки мыши. Анализ представляющего интерес белка в сыворотке сопряжен с многочисленными дополнительными проблемами, включая гетерогенность представляющего интерес белка из-за биотрансформации и помехи из-за комплексной матрицы, такой как сывороточные белки с высокой концентрацией.

[100] Получали Fab<sub>2</sub>-фрагменты мАт1, как описано ранее, и подвергали их анализу нативной SCX-МС. Линейность отношения коэффициентов чувствительности детектора (измеренная интенсивность анализируемого вещества, нормализованная по внутреннему стандарту) к фактической концентрации антитела показана на ФИГ. 5А. На ФИГ. 5В и ФИГ. 5С показаны дополнительные вставки, демонстрирующие линейность ответа даже при низких концентрациях. Эти результаты демонстрируют чувствительность и эффективность способа по настоящему изобретению при количественном определении антител даже при низких концентрациях в сыворотке.

[101] Стабильность способа по настоящему изобретению была дополнительно продемонстрирована путем построения графика линейности измеренной интенсивности без нормализации по внутреннему стандарту по сравнению с концентрацией антител, как показано на ФИГ. 6А. На ФИГ. 6В и 6С показаны дополнительные вставки, демонстрирующие линейность измеренной интенсивности при низких концентрациях в сыворотке, даже без нормализации по внутреннему стандарту.

[102] Масс-спектры, иллюстрирующие LOD и LOQ Fab<sub>2</sub> мАт1 в сыворотке и в чистом растворе, показаны на ФИГ. 7. Было определено, что LOD составляет всего лишь 0,025 мкг/мл в сыворотке, что эквивалентно 50 пг на колонке SCX, как показано на ФИГ. 7А. Было определено, что LOQ составляет всего лишь 0,05 мкг/мл в сыворотке, что

эквивалентно 100 пг на колонке SCX, как показано на ФИГ. 7В. Отношение сигнал/шум (S/N), составляющее 5, считается разумным стандартом для установления LOQ. Абсолютная интенсивность Fab<sub>2</sub> mAb1, обнаруженная в образцах сыворотки, была выше, чем абсолютная интенсивность, обнаруженная в чистом растворе, что позволяет предположить, что предел чувствительности образцов сыворотки обусловлен шумом от сывороточного белка, подвергнутого совместному IPed.

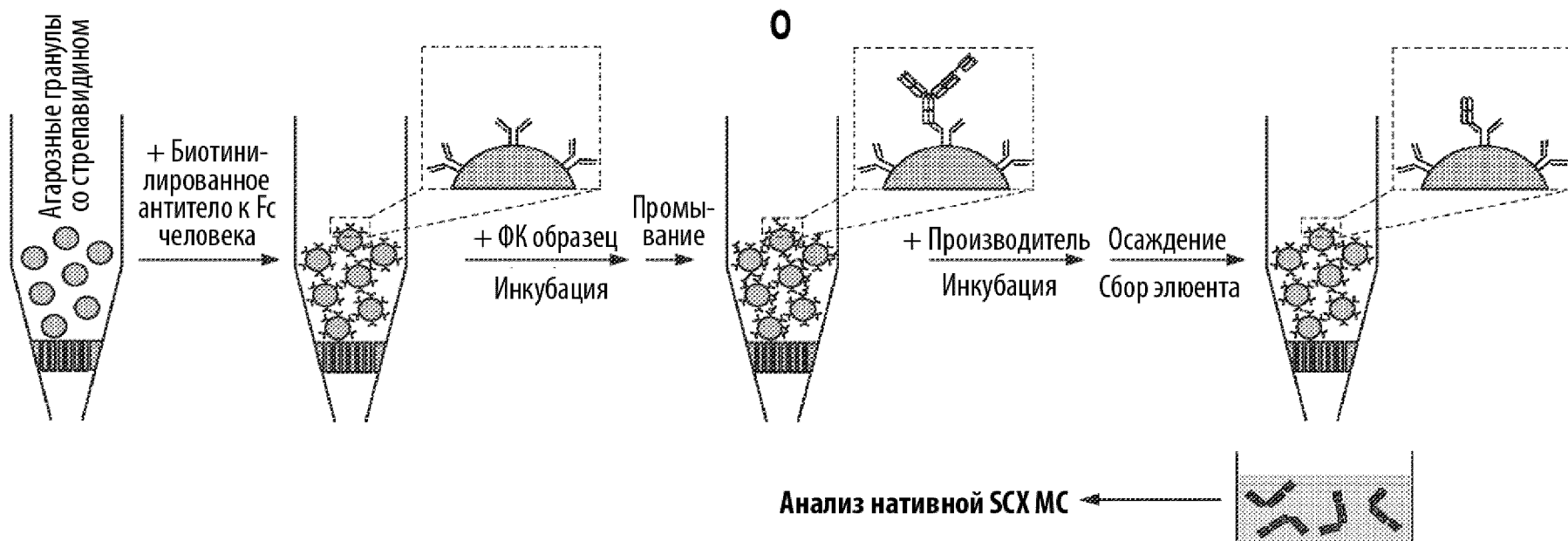
[103] В дополнение к примерам, раскрытым в настоящем документе, даже более низкие LOD и LOQ возможны при использовании способа по настоящему изобретению в более благоприятных условиях, которые известны специалисту в данной области техники, например при использовании антитела с более поздним временем элюирования или использовании большего объема промывания во время IP.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ определения характеристик антитела, включающий:
  - (a) иммобилизацию указанного антитела на твердофазном субстрате;
  - (b) приведение указанного иммобилизованного антитела в контакт с расщепляющим ферментом с получением несвязанного фрагмента указанного антитела;
  - (c) элюирование указанного фрагмента антитела; и
  - (d) подвергание указанного элюата анализу нативной SCX-МС для определения характеристик указанного антитела.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой моноклональное антитело или биспецифическое антитело.
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная стадия иммобилизации включает приведение образца, содержащего указанное антитело, в контакт с твердофазным субстратом, способным связываться с указанным антителом.
4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный твердофазный субстрат содержит гранулы.
5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что указанные гранулы представляют собой агарозные гранулы или магнитные гранулы.
6. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанное связывание осуществляется с помощью антитела, прикрепленного к указанному твердофазному субстрату.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой антитело к Fc.
8. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию промывания указанного твердофазного субстрата после иммобилизации указанного антитела.
9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный расщепляющий фермент представляет собой IdeS или его вариант.
10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный фрагмент антитела представляет собой Fab<sub>2</sub>-фрагмент.
11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное элюирование включает стадию центрифугирования указанного твердофазного субстрата и указанного фрагмента антитела.
12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная система SCX соединена с указанным масс-спектрометром.
13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр с тройным квадруполем.
14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное определение характеристик антитела включает количественное определение антитела, причем указанное количественное определение необязательно нормализуют по внутреннему стандарту.
15. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанный образец представляет собой

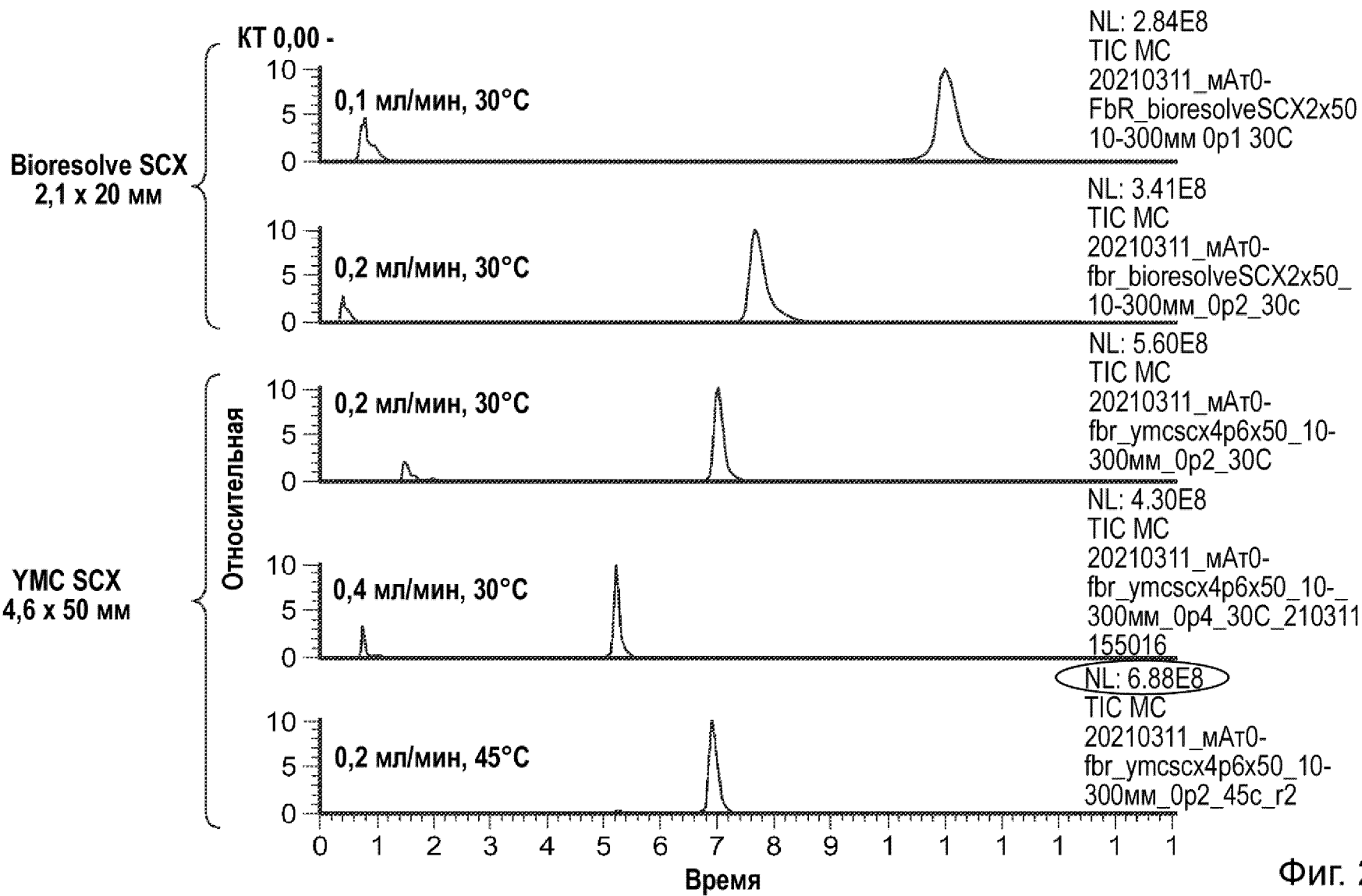
образец сыворотки.

По доверенности



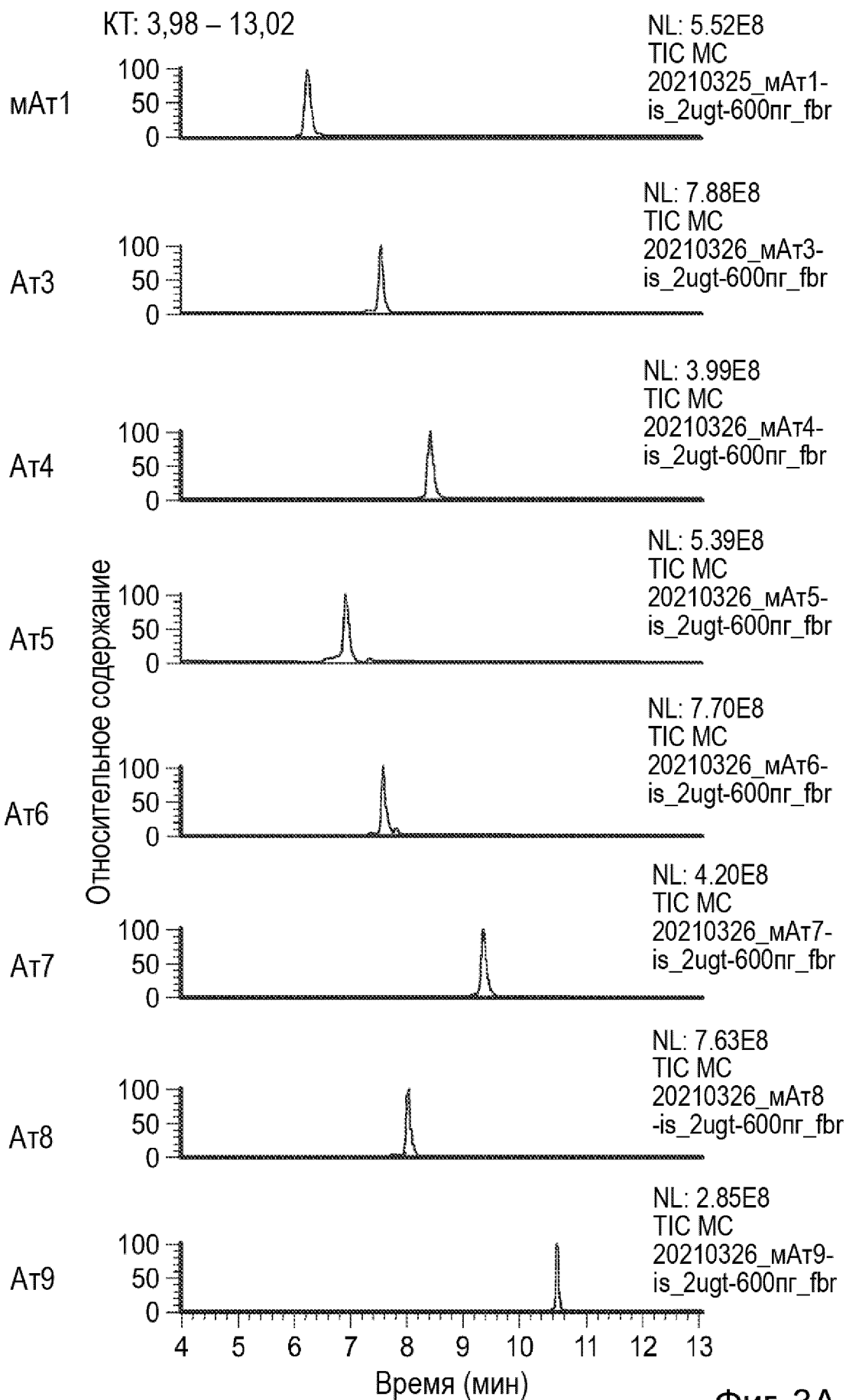
1/11

Фиг. 1

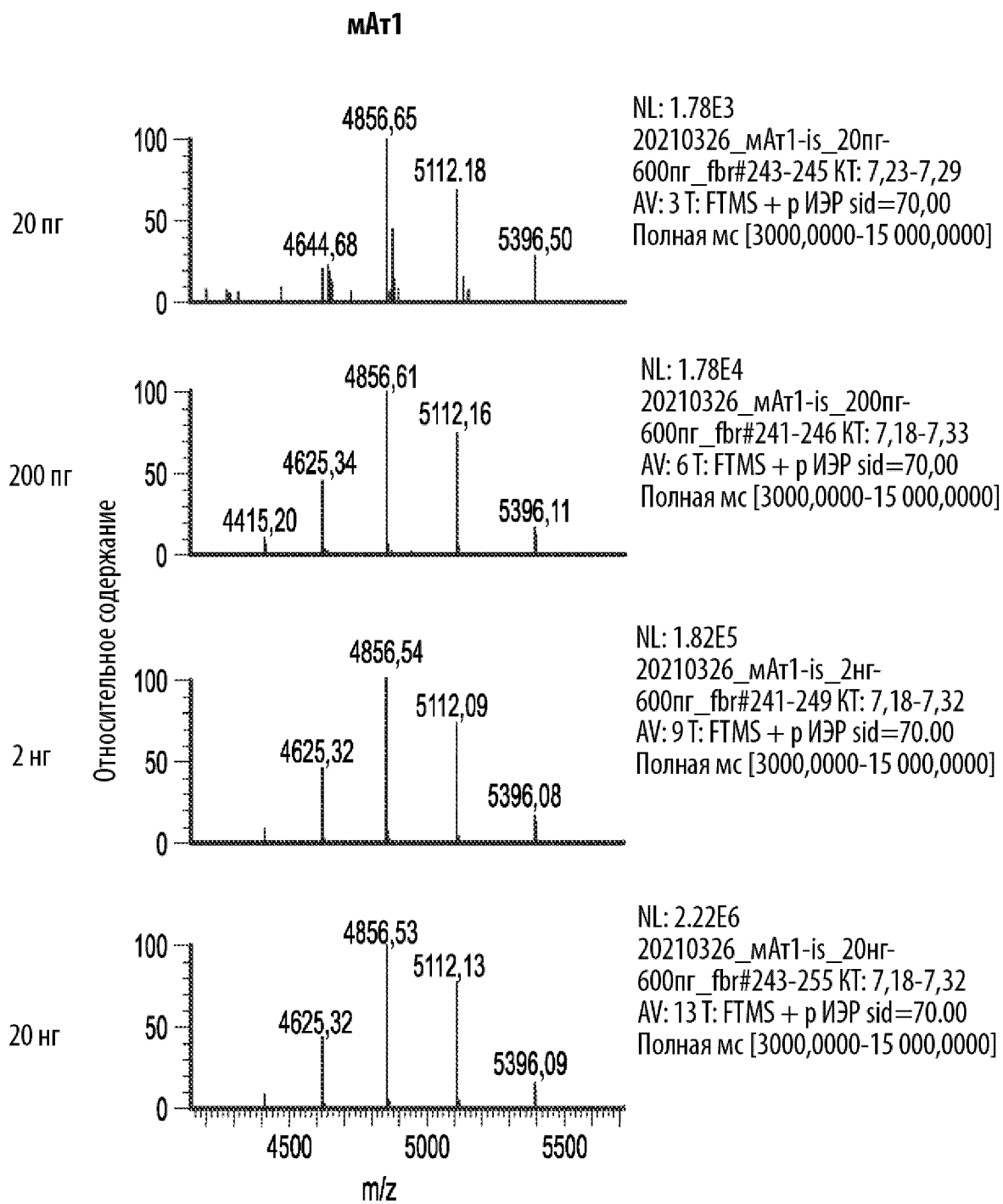


2/11

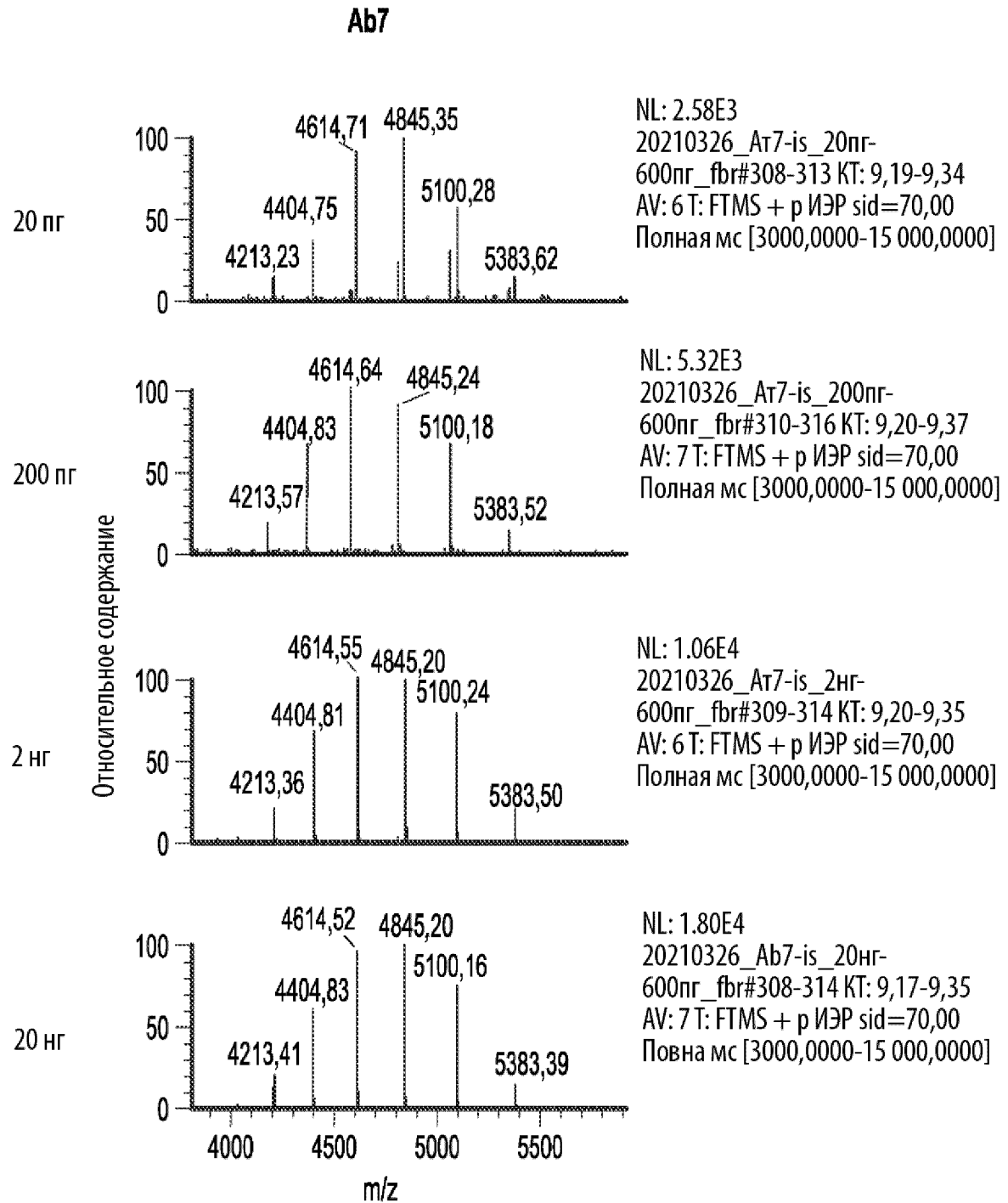
Фиг. 2





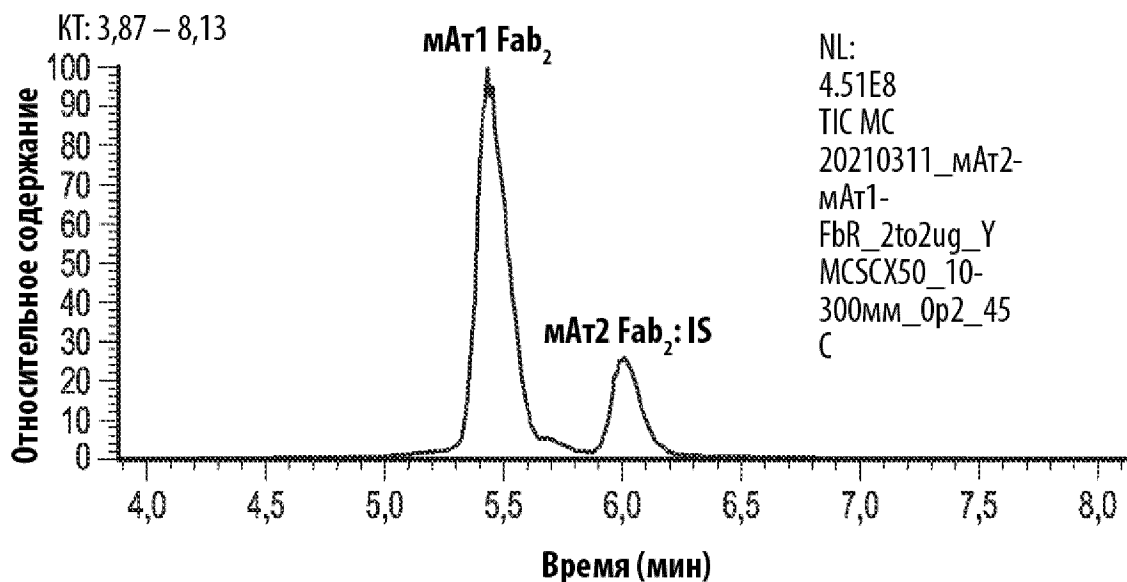


Фиг. 3В

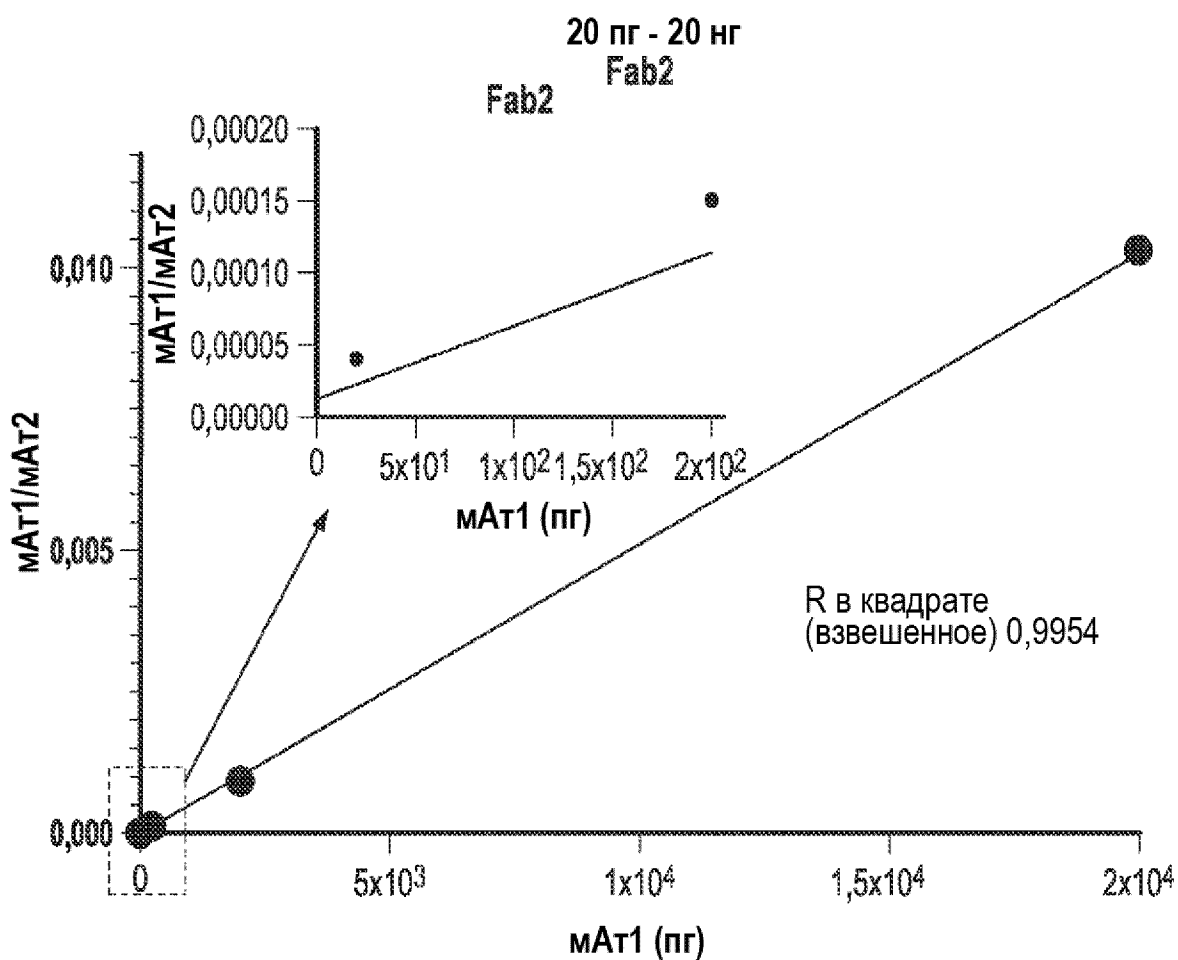


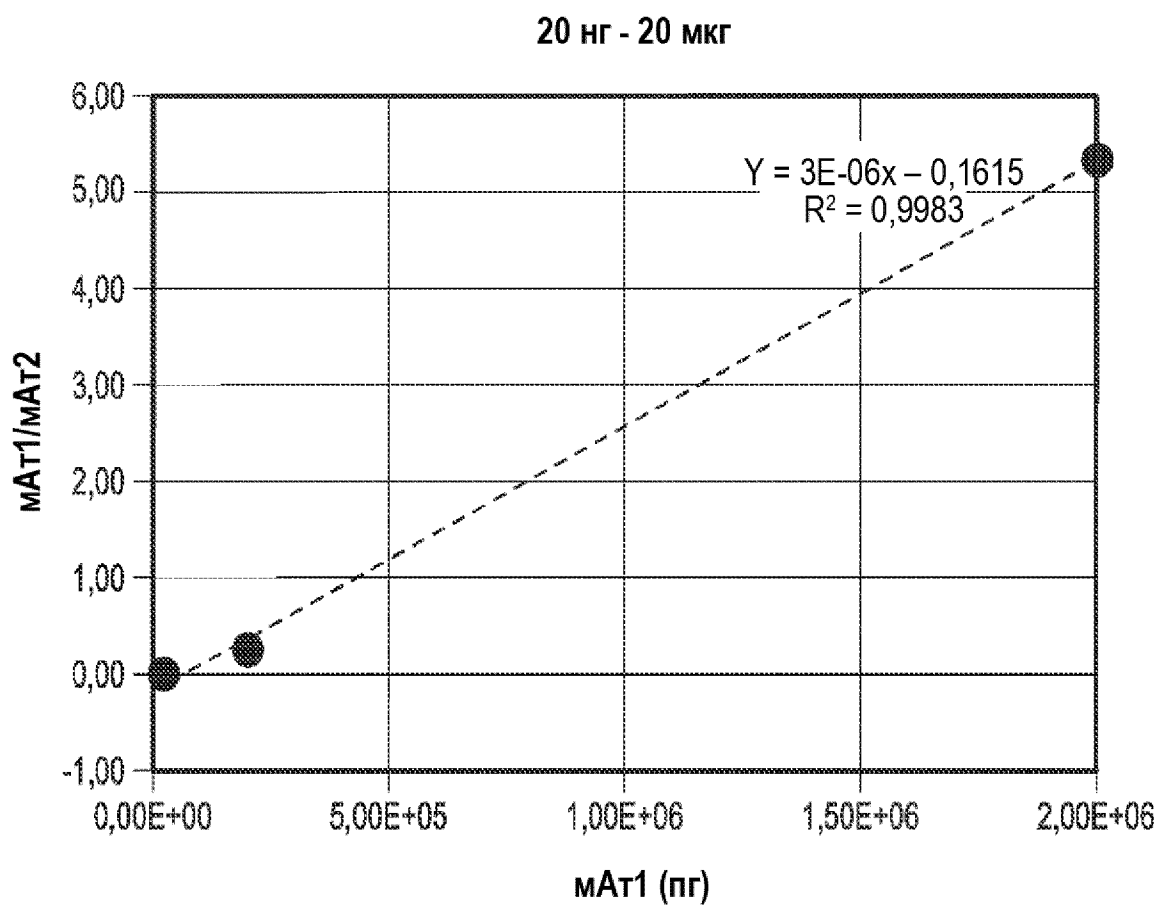
Фиг. 3С

Фиг. 4А



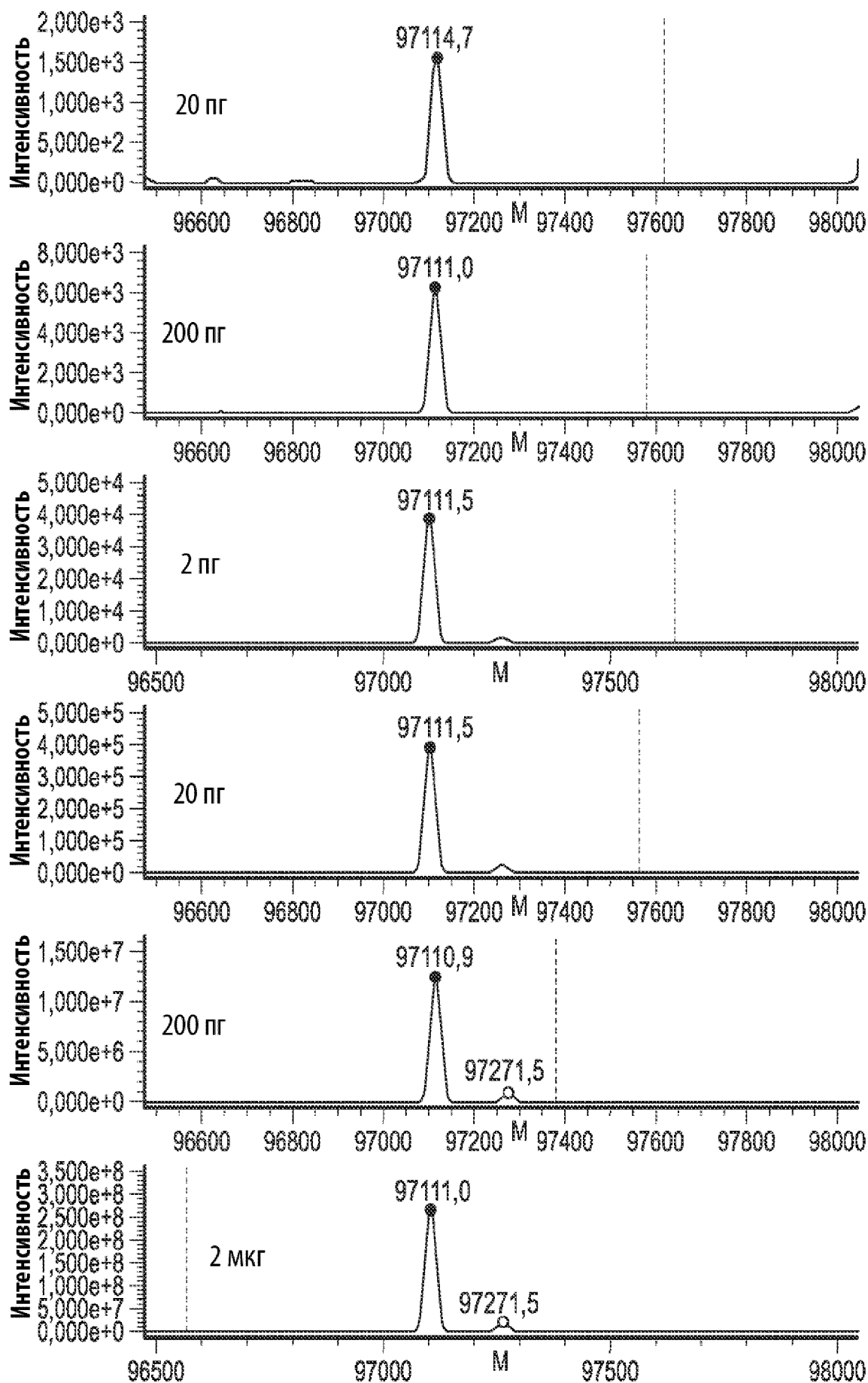
Фиг. 4В





Фиг. 4С

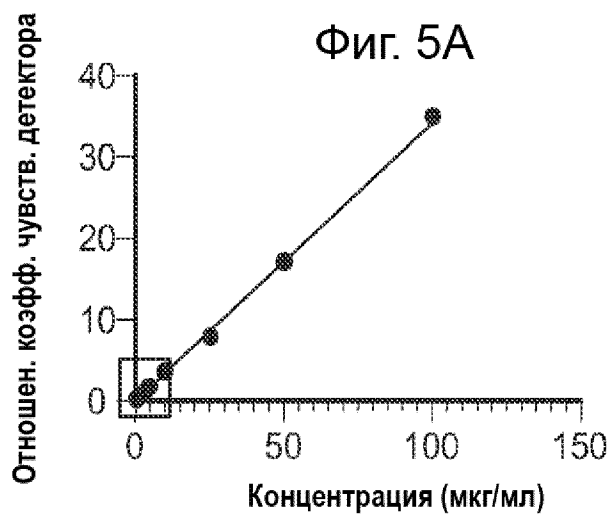
8/11



Фиг. 4D

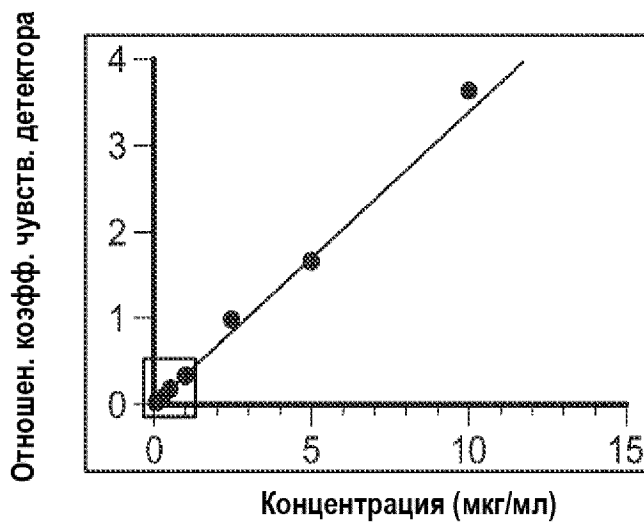
9/11

Фиг. 5А

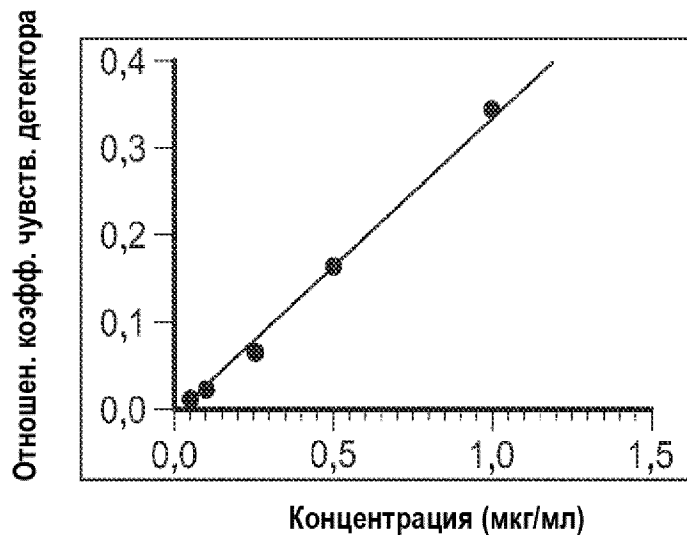


$1/x^2$  взвеш. линейн. приближ.:  $Y = 0,3405X - 0,006524$   
 $R^2 = 0,9896$

Фиг. 5В

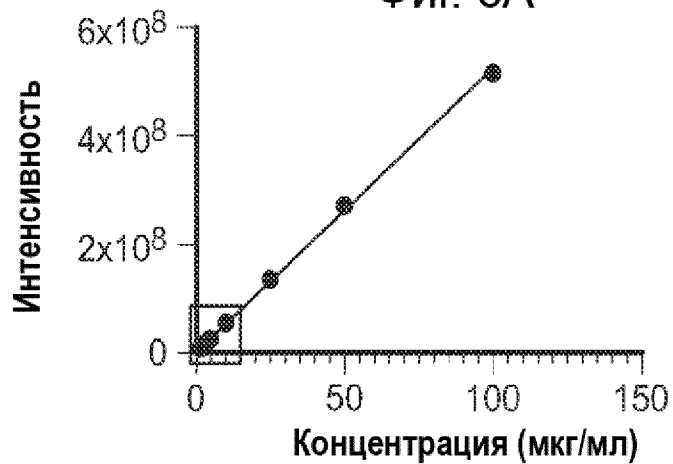


Фиг. 5С



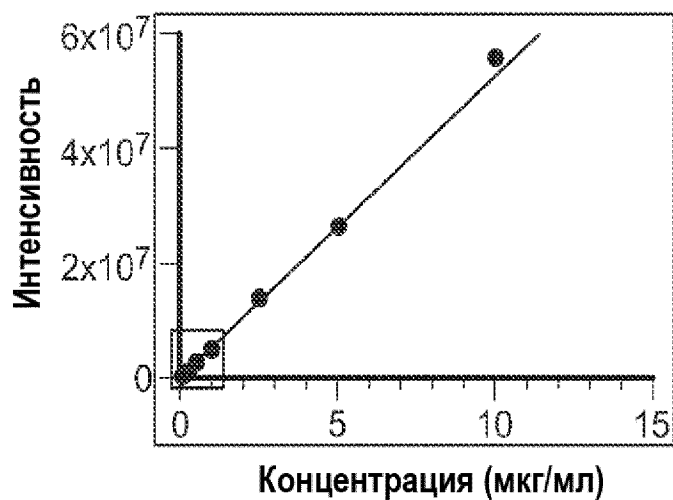
10/11

Фиг. 6А

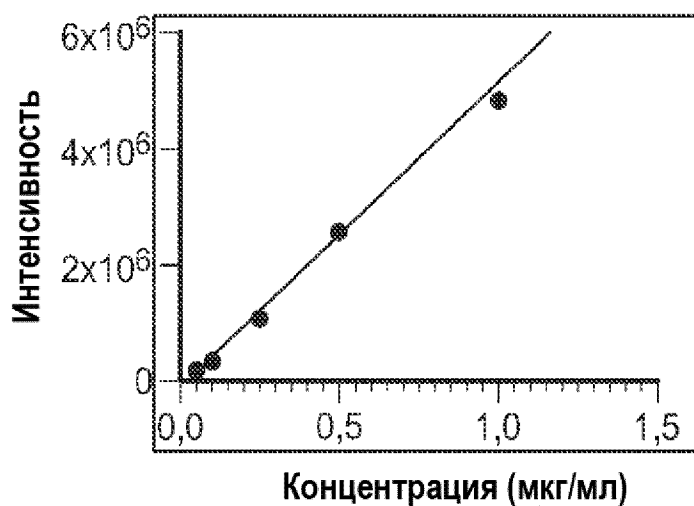


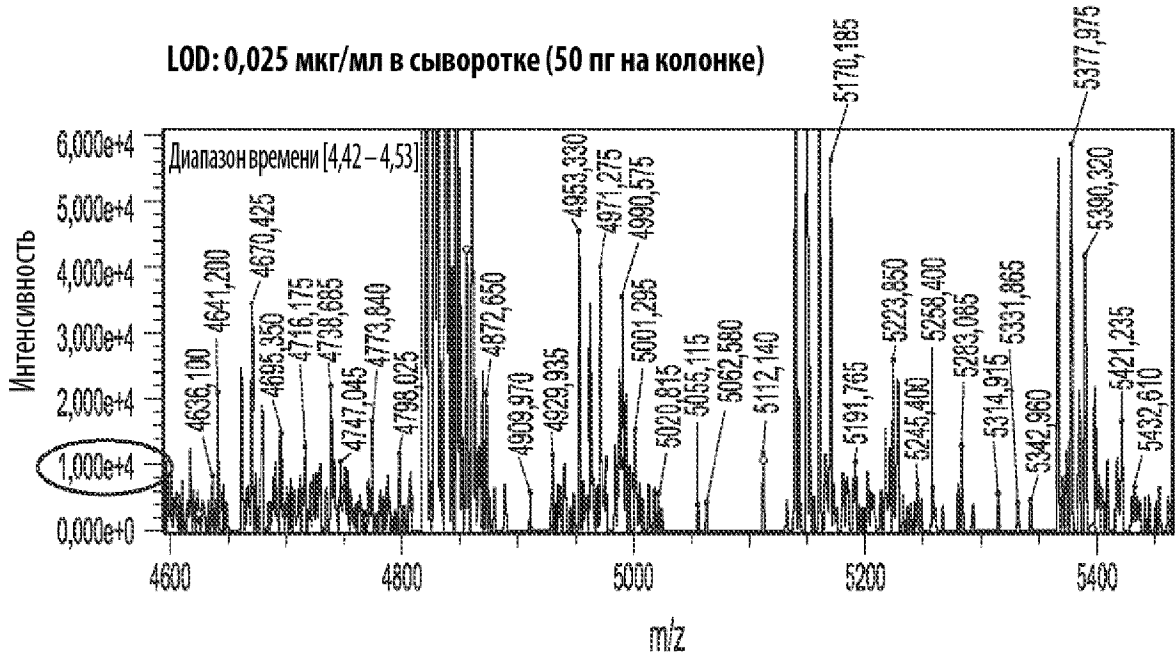
$1/x^2$  взвеш. линейн. приближ.:  $Y = 5267133X - 100778$   
 $R^2 = 0,9940$

Фиг. 6В

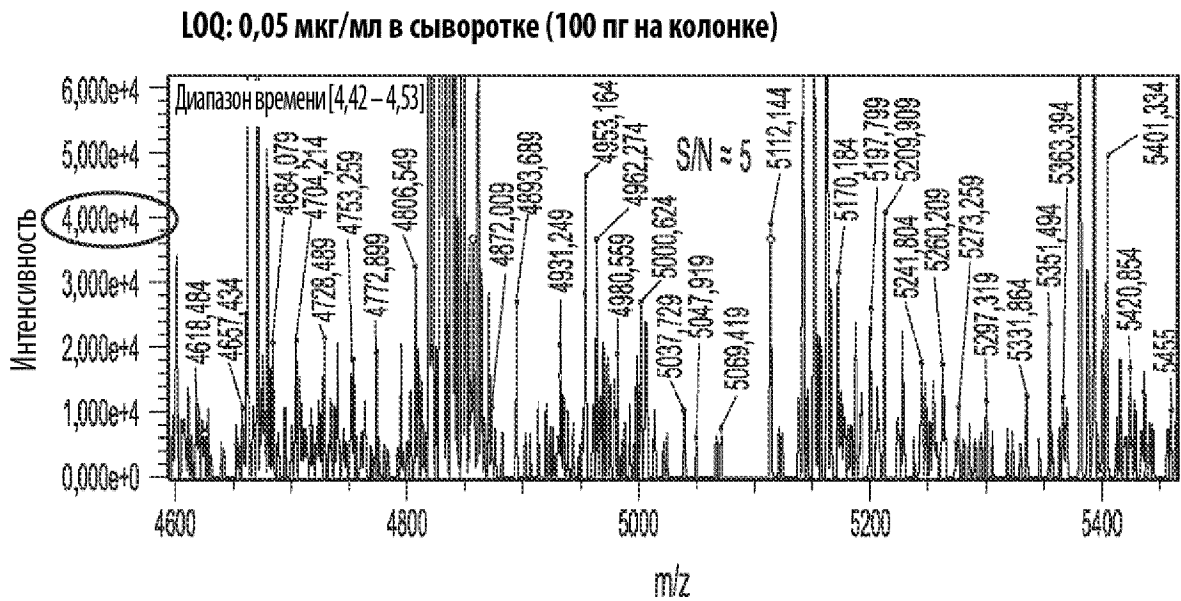


Фиг. 6С





Фиг. 7А



Фиг. 7В