

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490213 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.25

(22) Дата подачи заявки
2022.07.12

(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)

(54) ОСНОВАННАЯ НА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ СТРАТЕГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С ПРОДУКТОМ ВАРИАНТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА

(31) 63/221,436

(32) 2021.07.13

(33) US

(86) PCT/US2022/036870

(87) WO 2023/287823 2023.01.19

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Янь Юэтянь, Чжан Чжэнци, Ванг
Шунхай (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к области определения характеристик белков и, в частности, к способам идентификации критических показателей качества терапевтических белков, экспрессируемых в клетках-хозяевах, путем осуществления рабочего процесса, включающего использование анализа конкурентного связывания с недостаточным антигеном с последующей SCX-МС.



202490213

A1

A1

202490213

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580253EA/032

ОСНОВАННАЯ НА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ СТРАТЕГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВЯЗАННЫХ С ПРОДУКТОМ ВАРИАНТОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной заявке на патент США № 63/221,436, поданной 13 июля 2021 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Изобретение в целом относится к способам определения связанных с препаратом вариантов, критически важных для поддержания структуры и функции биологического препарата, с использованием рабочего процесса масс-спектрометрии с конкурентным связыванием.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Биологические препараты стали важными лекарственными средствами для лечения рака, аутоиммунных заболеваний, инфекций и кардиометаболических расстройств и представляют собой один из наиболее быстрорастущих сегментов препаратов фармацевтической отрасли. Биологические препараты должны соответствовать очень высоким стандартам чистоты. Таким образом, может быть важно контролировать примеси на разных стадиях разработки, производства, хранения лекарственных средств и обращения с ними. Часто бывает сложно полностью оценить влияние большого количества показателей качества, которые могут быть связаны с безопасностью и эффективностью. Также сложно полностью охарактеризовать влияние параметров производственного процесса и свойств материалов на изменения качества препаратов. **[0004]** Для обеспечения надежных производственных операций важно, чтобы интегрированную стратегию контроля разрабатывали и совершенствовали с течением времени на основе систематического определения характеристик процесса, а также осуществления соответствующей оценки рисков и их снижения на протяжении всего жизненного цикла препаратов. Таким образом, существует потребность в стандарте проектирования качества. Всемирная организация здравоохранения ООН рекомендует проектирование качества в качестве стандарта, поскольку труднее (и практически невозможно) реализовать эффективные средства контроля качества исключительно путем тестирования препаратов постфактум. Критические показатели качества (CQA) служат ориентировочными показателями, вокруг которых вращается большинство реализаций проектирования качества. CQA представляет собой физическое, химическое, биологическое или микробиологическое свойство или характеристику, которые должны находиться в соответствующих пределах, диапазоне или распределении для обеспечения требуемого качества препарата. CQA обычно связаны с лекарственным веществом, вспомогательными веществами, промежуточными продуктами (материалами в процессе производства) и лекарственным препаратом. Для биологических препаратов CQA могут

представлять собой примеси, связанные с препаратом или процессом. Примеси, связанные с препаратом, могут включать в себя варианты размера (агрегаты или фрагменты), варианты с посттрансляционными модификациями или варианты заряда. Примеси, связанные с процессом, являются неотъемлемой частью процесса, например ДНК клеток-хозяев или белки клеток-хозяев (НСР), выщелачиваемые вещества (такие как белок А) и вирусы. Присутствие этих примесей в конечном лекарственном препарате может повлиять на чистоту, эффективность и стабильность препарата.

[0005] Таким образом, определение CQA для биологических препаратов может представлять собой сложный процесс. В настоящее время жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), масс-спектрометрию с ионизацией электрораспылением (ИЭР-МС), фракционирование или идентификацию вариантов можно использовать для определения физико-химических характеристик интактных или расщепляемых биологических препаратов. Определение характеристик активности может быть выполнено с использованием биоанализов на основе ИФА, клеточных биоанализов или поверхностного плазмонного резонанса (SPR) или биослойной интерферометрии (BLI) для определения активности связывания. В отношении этих способов связанные с продуктом CQA необходимо сначала обогатить или выделить, а затем оценить по отдельности или на основе опыта или предварительных знаний. Такой подход к рабочему процессу может приводить к низкой пропускной способности.

[0006] Таким образом, в данной области техники давно существует потребность в эффективном способе определения таких показателей контроля качества.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Типовые варианты реализации изобретения, раскрытые в настоящем документе, удовлетворяют вышеупомянутым требованиям, предлагая способы идентификации связанных с продуктом CQA путем их насыщения.

[0008] В настоящем изобретении предложено определение характеристик по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта причем указанный способ включает в себя получение образца, содержащего представляющий интерес белок, и по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта указанного представляющего интерес белка; приведение указанного образца в контакт с условиями конкурентного связывания, включая недостаточную мишень, иммобилизованную на гранулах; промывание указанных гранул для сбора проточного продукта; подвергание указанного проточного продукта анализу жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией для разделения указанного представляющего интерес белка и указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта; и сравнение содержания указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта с содержанием указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта, полученного в результате анализа жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией контрольного образца, перед приведением указанного образца в контакт с указанными условиями конкурентного

связывания для определения характеристик указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта.

[0009] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения мишень представляет собой антиген, против которого направлен представляющий интерес белок.

[0010] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения условия связывания обеспечивают недостаточную мишень, иммобилизованную на гранулах. В том же или другом аспекте данного варианта реализации изобретения по меньшей мере один связанный с продуктом вариант нарушает связывание с указанной недостаточной мишенью.

[0011] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения жидкостная хроматография представляет собой катионообменную хроматографию. В одном конкретном аспекте данного варианта реализации изобретения жидкостная хроматография представляет собой хроматографию с сильным катионным обменом.

[0012] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением. В одном конкретном аспекте данного варианта реализации изобретения масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

[0013] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения указанные гранулы являются магнитными. В другом аспекте данного варианта реализации изобретения указанные гранулы являются немагнитными. В одном дополнительном аспекте указанные гранулы представляют собой агарозные гранулы. В еще одном аспекте указанные гранулы могут быть покрыты пептидом или белком.

[0014] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения указанный проточный продукт насыщен для указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта.

[0015] В том же или другом аспекте данного варианта реализации изобретения указанный проточный продукт собирают путем выполнения центрифугирования.

[0016] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения указанную мишень биотинилируют перед иммобилизацией на указанных гранулах. В том же или других аспектах данного варианта реализации изобретения указанные гранулы покрыты стрептавидиновой смолой. В одном конкретном аспекте данного варианта реализации изобретения указанные гранулы являются немагнитными. В другом конкретном аспекте указанные гранулы являются магнитными.

[0017] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения указанная недостаточная мишень выполнена таким образом, что количество указанной мишени обеспечивает связывание от около 30% до около 80% представляющего интерес белка.

[0018] В другом аспекте данного варианта реализации изобретения указанный образец инкубируют в течение около часа перед промыванием. В том же или других аспектах данного варианта реализации изобретения указанный образец перед промыванием инкубируют при комнатной температуре.

[0019] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения данный способ может идентифицировать более чем один связанный с продуктом вариант. В одном конкретном аспекте указанный связанный с продуктом вариант включает в себя вариант размера. В одном конкретном аспекте указанный вариант размера представляет собой вариант фрагментации указанного представляющего интерес белка. В одном конкретном аспекте указанный вариант размера представляет собой вариант агрегации указанного представляющего интерес белка.

[0020] В одном аспекте варианта реализации изобретения указанный связанный с продуктом вариант включает в себя вариант заряда указанного представляющего интерес белка. В одном конкретном аспекте указанный связанный с продуктом вариант включает в себя посттрансляционно модифицированный вариант указанного представляющего интерес белка.

[0021] В одном аспекте данного варианта реализации изобретения указанный связанный с продуктом вариант классифицируется как критический показатель качества, если указанное содержание указанного по меньшей мере связанного с продуктом варианта значительно превышает указанное содержание указанного по меньшей мере связанного с продуктом варианта в образце до приведения в контакт указанного образца с указанными условиями конкурентного связывания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0022] На ФИГ. 1 представлены возможные различные связанные с продуктом варианты антитела, включая варианты размера, варианты заряда и посттрансляционные модификации (ПТМ).

[0023] На ФИГ. 2 представлены способы, обычно используемые для определения или контроля СQA во время разработки белковых лекарственных средств.

[0024] На ФИГ. 3А показан способ идентификации по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[0025] На ФИГ. 3В показан способ идентификации по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[0026] На ФИГ. 4 показаны дизайн способа и рабочий процесс для способа идентификации по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[0027] На ФИГ. 5 показаны дизайн способа и рабочий процесс для определения соотношения антигена и антитела в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[0028] На ФИГ. 6 показана кривая титрования, полученная для определения соотношения антигена и антитела, в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[0029] На ФИГ. 7 показана хроматограмма образца, не насыщенного связанными с

продуктом вариантами мАт1 в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения.

[0030] На ФИГ. 8 показано сравнение хроматограмм образца, насыщенного связанными с продуктом вариантами мАт1, с пониженной аффинностью связывания в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения с контрольным экспериментом.

[0031] На ФИГ. 9 показано сравнение экстрагированных ионных хроматограмм (ХИС) различных связанных с продуктом вариантов мАт1, насыщенных связанными с продуктом вариантами, с пониженной аффинностью связывания в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения, с контрольным экспериментом.

[0032] На ФИГ. 10 показан график относительных процентных содержаний связанных с продуктом вариантов мАт1, идентифицированных с использованием способа в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения и контрольного эксперимента.

[0033] На ФИГ. 11 показана структура бсАт1.

[0034] На ФИГ. 12 показано сравнение ХИС образца, насыщенного связанными с продуктом вариантами мАт2 с пониженной аффинностью связывания в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения и контрольным экспериментом.

[0035] На ФИГ. 13 показан график относительных процентных содержаний варианта дезамидирования бсАт1, идентифицированного с использованием способа в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения и контрольным экспериментом.

[0036] На ФИГ. 14 показан график относительных процентных содержаний связанных с продуктом вариантов бсАт1, идентифицированных с использованием способа в соответствии с одним типовым вариантом реализации изобретения и контрольным экспериментом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0037] Идентификация и количественное определение связанных с продуктом вариантов биологических препаратов могут иметь очень важное значение во время производства и разработки препарата. Идентификация таких вариантов может иметь решающее значение для разработки безопасного и эффективного препарата. Следовательно, могут оказаться полезными надежный способ и/или рабочий процесс для определения характеристик СQA.

[0038] В Приложении к ICH Q8 СQA определены как физические, химические, биологические или микробиологические свойства или характеристики, которые должны находиться в соответствующих пределах, диапазоне или распределении для обеспечения требуемого качества препарата, безопасности/иммуногенности, эффективности и фармакодинамики/фармакокинетики. (Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств США. Отраслевое руководство: Фармацевтическая разработка Q8(R2). www.fda.gov/media/71535/download). Таким образом, СQA должны

находиться в соответствующих пределах, диапазоне или распределении для обеспечения требуемого качества, безопасности и эффективности препарата. Например, было показано, что для терапевтических средств на основе моноклональных антител, клиническая активность которых зависит от опосредованной кристаллизуемой фракцией (Fc) эффекторной функции, концевые сахара Fc-гликанов имеют критически важное значение для безопасности или эффективности. Такие CQA включают в себя связанные с продуктом варианты, такие как варианты размера и заряда, которые могут влиять на связывание представляющего интерес белка.

[0039] На ФИГ. 1 показан неограничивающий пример вариантов, которые могут влиять на критический показатель качества белка. В случае антитела, представленного на ФИГ. 1, связанные с продуктом примеси могут представлять собой варианты размера, такие как продукты фрагментации (LMW) и продукты агрегации (HMW). Другие связанные с продуктом примеси могут представлять собой варианты заряда, образующиеся вследствие блокирования N-конца, образования дисульфидной связи, отсечения C-конца, микрогетерогенности Fc-гликанов или посттрансляционных модификаций. Это может приводить к снижению связывания представляющего интерес белка и потребности в контроле на различных этапах процесса производства и доставки.

[0040] Один из традиционных способов включает в себя использование хроматографии с сильным катионным обменом (SCX). Один такой рабочий процесс показан на ФИГ. 2. Он включает в себя разделение представляющего интерес белка и его вариантов с помощью SCX с последующим проведением анализа связывания представляющего интерес белка и его варианта для определения того, был ли поврежден ли вариант, т. е. была ли снижена аффинность связывания по сравнению с представляющим интерес белком.

[0041] Учитывая ограничения существующих способов, были разработаны эффективные и действенные способы идентификации и количественного определения видов димеров.

[0042] Если не описано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя на практике или в испытаниях могут быть использованы любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, далее описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0043] Следует понимать, что термин в единственном числе означает «по меньшей мере один»; и термины «около» и «приблизительно» допускают стандартные вариации, как это понятно специалистам в данной области техники; и если указаны диапазоны, включены конечные значения.

[0044] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения в изобретении предлагается способ идентификации по меньшей мере одного связанного с продуктом

варианта в образце, содержащем представляющий интерес белок.

[0045] В контексте настоящего документа термин «белок» или «представляющий интерес белок» включает в себя 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, родственных структурных вариантов природного происхождения и их синтетических аналогов неприродного происхождения. «Синтетические пептиды или полипептиды» относятся к пептиду или полипептиду неприродного происхождения. Синтетические пептиды или полипептиды можно синтезировать, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Известны различные способы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или несколько полипептидов, образуя единую функционирующую биомолекулу. Белок может 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. В другом типовом аспекте белок может включать в себя фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т. п. Белки можно получать с использованием рекомбинантных клеточных продуцирующих систем, таких как баккуловиральная система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*),

системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). 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», (BIOTECHNOL. GENET. ENG. REV. 147-175 (2012)). В некоторых типовых вариантах реализации изобретения белки содержат 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), микопептид глутатион-S-трансферазы (GST), флуоресцентные метки и другие красители и т. п. Белки можно классифицировать на основе составов и растворимости, и, таким образом, они могут включать в себя простые белки, такие как глобулярные белки и фибриллярные белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белка, такие как первичные производные белка и вторичные производные белка.

[0046] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело или Fc-слитый белок.

[0047] 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 называемую в настоящем документе HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно называемую в настоящем документе LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и

V_L можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающимися с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных типовых вариантах реализации изобретения FR антитела к большому ET-1 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Термин «антитело» в контексте настоящего документа также включает в себя антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п. в контексте настоящего документа включают в себя любой получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин природного происхождения, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление, или методов рекомбинантной геномной инженерии, включающих манипуляцию и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител) или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и манипулировать химическим путем или с использованием методов молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

[0048] В контексте настоящего документа «фрагмент антитела» включает в себя

часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или вариабельная область антитела. Примеры фрагментов антител включают в себя, без ограничений, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fc-фрагмент, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, dsFv-диатело, dAb-фрагмент, Fd'-фрагмент, Fd-фрагмент и выделенную определяющую комплементарность область (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Fv-фрагменты представляют собой комбинацию вариабельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные молекулы одноцепочечных полипептидов, в которых вариабельные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. Фрагмент антитела может быть получен различными способами. 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 альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела необязательно может содержать фрагмент одноцепочечного антитела. В альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может содержать несколько цепей, связанных друг с другом, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела необязательно может содержать мультимолекулярный комплекс.

[0049] Термин «моноклональное антитело» в контексте настоящего документа не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любыми доступными или известными в данной области техники способами. Моноклональные антитела, применимые в настоящем описании, можно получить с использованием широкого разнообразия методов, известных в данной области техники, включая использование технологий гибридного, рекомбинантного и фагового дисплея или их комбинации.

[0050] Термин «Fc-слитые белки» в контексте настоящего документа включает в себя частично или полностью два или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые не слиты в их естественном состоянии. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая Fc-домен), было описано, например, в Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., «Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins», in Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11, 1992. «Fc-слитые белки рецептора» содержат одно или более из одного или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах реализации изобретения содержит шарнирную область, за которой следуют домены CH₂ и CH₃ иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-слитый белок

содержит две или более отдельных рецепторных цепей, которые связываются с одним или более чем одним лигандом(-ами). Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 (например, Рилонацепт, который содержит область связывания лиганда IL-1 RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. патент США № 6,927,004, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки) или ловушка VEGF (например, Афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора VEGF Flk1, слитым с Fc hIgG1; например, SEQ ID NO:1; см. патент США №№ 7,087,411 и 7,279,159, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки).

[0001] В контексте настоящего документа термин «мишень» относится к любой молекуле, которая может специфически взаимодействовать с терапевтическим белком с целью достижения фармакологического эффекта. Например, мишень антитела может представлять собой антиген, против которого оно направлено; мишень лиганда может представлять собой рецептор, с которым он предпочтительно связывается, и наоборот; мишень фермента может представлять собой субстрат, с которым он предпочтительно связывается; и т. д. Один терапевтический белок может иметь более чем одну мишень. В соответствии с конкретным применением в способе по изобретению подходящими являются различные мишени. Мишень может, например, присутствовать на поверхности клетки, может быть растворимой, может быть цитозольной или может быть иммобилизована на твердой поверхности. Мишень может представлять собой рекомбинантный белок. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения мишень может представлять собой антиген.

[0051] 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. Примесь может также иметь известную структуру, частично охарактеризованную или неидентифицированную.

[0052] Связанные с процессом примеси можно получать в результате процесса производства, и они могут включать в себя три основные категории: полученные из клеточного субстрата, полученные из клеточной культуры и полученные на последующих стадиях. Примеси, полученные из клеточного субстрата, включают в себя, без ограничений, белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или тотальную ДНК клетки-хозяина). Примеси, полученные из клеточной культуры, включают в себя, без ограничений, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты питательной среды. Примеси, полученные на последующих стадиях, включают в себя, без ограничений, ферменты, реагенты химической и биохимической обработки (например, бромистый циан, гуанидин, окислительные и восстановительные агенты), неорганические соли (например, тяжелые металлы, мышьяк, ионы неметаллов), растворители, носители, лиганды (например,

моноклональные антитела) и другие выщелачиваемые вещества. [0053] Связанные с продуктом примеси (например, предшественники, некоторые продукты расщепления), могут представлять собой молекулярные варианты, возникающие в процессе производства и/или хранения, которые не обладают свойствами, сравнимыми со свойствами требуемого препарата с точки зрения активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут требовать значительных усилий по выделению и определению характеристик для идентификации типа модификации(-й). Связанные с продуктом примеси могут включать в себя усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются под действием гидролитических ферментов или химических веществ, катализирующих расщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают в себя, без ограничений, дезамидированные, изомеризованные, несовпадающие S-S-связанные, окисленные или измененные конъюгированные формы (например, гликозилирование, фосфорилирование). Модифицированные формы также могут включать в себя любую посттрансляционно модифицированную форму. Агрегаты включают в себя димеры и более высокие кратные количества требуемого препарата. (Характеристики Q6B: Процедуры испытаний и критерии приемлемости биотехнологических/биологических препаратов, ICH, август 1999 г., Министерство здравоохранения и социальных служб США).

[0054] Некоторые связанные с продуктом примеси или связанные с продуктом варианты белков имеют нарушенную аффинность связывания. Нарушенная аффинность связывания в данном случае включает в себя пониженную аффинность связывания с мишенью представляющего интерес белка в организме или антигене, разработанном для представляющего интерес белка. Нарушенная аффинность связывания может представлять собой любую аффинность, которая меньше, чем аффинность представляющего интерес белка к мишени представляющего интерес белка в организме или антигену, сконструированному для представляющего интерес белка.

[0055] В настоящем документе общий термин «посттрансляционные модификации» или «ПТМ» относится к ковалентным модификациям, которым подвергаются полипептиды либо во время (котрансляционной модификации), либо после (посттрансляционной модификации) их рибосомального синтеза. ПТМ обычно вводят с помощью специфических ферментов или ферментных путей. Многие из них возникают на сайте специфической характерной последовательности белков (сигнатурной последовательности) внутри белкового остова. Было зарегистрировано несколько сотен ПТМ, и эти модификации неизменно влияют на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. «Proteins» (2014) second edition, published by Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансляционные модификации включают 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, сульфониование, пренилирование, витамин С-зависимые модификации

(гидрокселирование 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 γ -карбоксиглутамата (остаток glu), глутамилирование (ковалентное присоединение остатков глутаминовой кислоты), глицилирование (ковалентное присоединение остатков глицина), гликозилирование (присоединение гликозильной группы к аспарагину, гидрокселизину, 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, которые изменяют химическую природу аминокислот, включают в себя без ограничений, цитруллинирование (превращение аргинина в цитруллин путем деиминирования) и дезамидирование (превращение глутамин в глутаминовую кислоту или аспарагин в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, которые включают в себя структурные изменения, включают в себя, без ограничений, образование дисульфидных мостиков (ковалентная связь двух цистеиновых аминокислот) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). Определенные посттрансляционные модификации включают в себя присоединение других белков или пептидов, например ISG-илирование (ковалентная связь с белком ISG15 (интерферон-стимулированный ген)), SUMO-илирование (ковалентная связь с белком SUMO (малый убиквитин-относящийся модификатор)) и убиквитинирование (ковалентная связь с белком убиквитином). См. источник информации European Bioinformatics Institute Protein Information Resource SIB Swiss Institute of Bioinformatics, European Bioinformatics Institute Drs - Drosomycin precursor - *Drosophila melanogaster* (Fruit fly) - Drs gene & protein, <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> (последнее посещение 15 января 2019 г.) для более подробного контролируемого перечня ПТМ по рекомендациям UniProt.

[0056] В контексте настоящего документа термин «хроматография» относится к процессу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью или газом, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального распределения химических соединений, когда они текут вокруг или выше неподвижной жидкости или твердой фазы. Неограничивающие примеры хроматографии включают в себя традиционную обращенно-

фазовую (RP), ионообменную (IEX) хроматографию, хроматографию смешанного режима и нормально-фазовую хроматографию (NP).

[0057] В контексте настоящего документа термин «катионообменная хроматография» означает хроматографический способ, в котором используют «материал для катионообменной хроматографии». Далее, в зависимости от природы заряженной группы, «материал для катионообменной хроматографии» называется, например, в случае материалов для катионообменной хроматографии с сульфокислотными группами (S) или карбоксиметильными группами (CM). В зависимости от химической природы заряженной группы «материал для катионообменной хроматографии» может быть дополнительно классифицирован как материал для хроматографии с сильным или слабым ионным обменом, в зависимости от дозировки ковалентно связанного заряженного заместителя. Например, материалы для хроматографии с сильным катионным обменом имеют сульфокислотную группу в качестве хроматографической функциональной группы.

[0058] Например, «материалы для катионообменной хроматографии», например, 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).

[0059] «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 HCX 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 ограничений, все имеющиеся в продаже материалы для катионообменной хроматографии, как описано выше. В примере по настоящему изобретению колонку YMC BioPro SP-F использовали в качестве материала для катионообменной хроматографии.

[0060] В контексте настоящего документа термин «масс-спектрометр» включает в себя устройство, способное идентифицировать конкретные виды молекул и измерять их точные массы. Подразумевается, что этот термин включает в себя любой молекулярный детектор, в котором полипептид или пептид можно элюировать для обнаружения и/или определения характеристик. Масс-спектрометр может содержать три основные части: источник ионов, масс-анализатор и детектор. Источник ионов предназначен для создания ионов газовой фазы. Атомы, молекулы или кластеры анализируемого вещества могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы одновременно (как при ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов во многом зависит от применения.

[0061] В некоторых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр может представлять собой масс-спектрометр с электрораспылением.

[0062] В контексте настоящего документа термин «ионизация электрораспылением» или «ИЭР» относится к процессу ионизации распылением, при котором катионы или анионы в растворе переходят в газовую фазу посредством образования и десольватации при атмосферном давлении потока высокозаряженных капель, которые образуются в результате приложения разности потенциалов между кончиком иглы электрораспылителя, содержащей раствор, и противозлектродом. Обычно существуют три основные стадии получения ионов газовой фазы из ионов электролита в растворе. Они включают в себя: (а) получение заряженных капель на кончике иглы для инфузии ES; (b) уменьшение объема заряженных капель путем испарения растворителя и многократного распада капель, что приводит к образованию небольших сильно заряженных капель, способных производить ионы газовой фазы; и (с) механизм образования ионов газовой фазы из очень маленьких и сильно заряженных капель. Стадии (а)-(с) обычно происходят в области атмосферного давления устройства.

[0063] В контексте настоящего документа термин «установка для инфузии электрораспылением» относится к системе ионизации электрораспылением, которая совместима с масс-спектрометром, используемым для массового анализа белка. При ионизации электрораспылением отверстие иглы электрораспыления расположено близко к входному отверстию спектрометра. Образец, содержащий представляющий интерес белок, можно закачать через иглу шприца. Электрический потенциал между отверстием иглы шприца и отверстием, ведущим к масс-анализатору, образует распыление («электрораспыление») раствора. Электрораспыление может осуществляться при атмосферном давлении и обеспечивает образование высокозаряженных капель раствора. Установка для инфузии электрораспылением может содержать электрораспыляющий капилляр, распыляемый газ и/или источник питания ИЭР. Установка может быть необязательно автоматизирована для выполнения аспирации образца, дозировки образца, подачи образца и/или распыления образца.

[0064] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может представлять собой масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

[0065] Термин «наноэлектрораспыление» 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, создающей наноэлектрораспыление, можно применять статический генератор наноэлектрораспыления или динамический генератор наноэлектрораспыления. Статический генератор наноэлектрораспыления проводит непрерывный анализ небольших объемов раствора образца (анализируемого вещества) в течение длительного времени. В динамическом генераторе наноэлектрораспыления применяют капиллярную колонку и систему подачи растворителя для осуществления хроматографического разделения смесей перед анализом на масс-спектрометре.

[0066] 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 для быстрого секвенирования белков, 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).

[0067] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометрию можно выполнять в нативных условиях.

[0068] В контексте настоящего документа термин «нативные условия», или «нативная МС», или «нативная ИЭР-МС» может включать в себя выполнение масс-спектрометрии в условиях, которые сохраняют нековалентные взаимодействия в анализируемом веществе. 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). Некоторые различия между нативной ИЭР и обычной ИЭР проиллюстрированы в таблице 1 и на ФИГ. 1 (Hao Zhang et al., *Native mass spectrometry of photosynthetic pigment-protein complexes*, 587 FEBS Letters 1012-1020 (2013)).

[0069] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр.

[0070] 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 массового разделения. 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 МСⁿ, можно выполнять путем сначала

выбора и выделения иона-предшественника (MS_2), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона (MS_3), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (MS_4) и т. д. до тех пор, пока можно получить значимую информацию или можно обнаружить сигнал фрагментного иона. Тандемную МС успешно выполняют с использованием самых разнообразных комбинаций анализаторов. То, какие анализаторы объединить для определенного применения, определяется 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 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.

[0071] 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 MS/MS , при этом последние генерируются по возможным пептидам в базе данных белковых последовательностей. Определение характеристик может включать 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.

[0002] 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 соответствующих последовательностей белков, включали базы данных, размещенные, например, на Uniprot или Swiss-prot. Поиск в базах данных можно осуществлять с использованием средств, называемых в настоящем документе «инструментами биоинформатики». Инструменты биоинформатики обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров MS/MS по всем возможным последовательностям в базе данных (базах данных) и предоставляют интерпретированные (аннотированные) спектры MS/MS в качестве выходных данных. Неограничивающими примерами таких

инструментов являются Mascot (www.matrixscience.com), Spectrum Mill (www.chem.agilent.com), PLGS (www.waters.com), PEAKS (www.bioinformaticssolutions.com), Proteinpilot (download.appliedbiosystems.com/proteinpilot), Phenyx (www.phenyx-ms.com), Sorcerer (www.sagenresearch.com), OMSSA (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/), X!Tandem (www.thegpm.org/TANDEM/), Protein Prospector (www.prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm), Byonic (www.proteinmetrics.com/products/byonic) или Sequest (fields.scripps.edu/sequest).

[0072] В некоторых вариантах реализации изобретения способ идентификации по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта может включать в себя использование анализа конкурентного связывания с недостаточным количеством антигена, иммобилизованного на твердой поверхности.

[0073] В контексте настоящего документа термин «твердая поверхность» может включать в себя любую поверхность, способную связываться с антигеном. Неограничивающие примеры твердой поверхности могут включать в себя аффинные смолы, гранулы и пластины, покрытые иммобилизованным белком, таким как авидин, стрептавидин или нейтравидин.

[0074] В некоторых вариантах реализации изобретения образец, содержащий представляющий интерес белок, может быть расщеплен после анализа конкурентного связывания, но до его оценки с помощью SCX-МС.

[0075] В некоторых вариантах реализации изобретения образец, содержащий представляющий интерес белок, можно обрабатывать путем добавления к образцу восстановительного агента.

[0076] В контексте настоящего документа термин «восстановление» или «восстановительный» относится к восстановлению дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающие примеры восстановительных агентов, используемых для восстановления белка, представляют собой дитиотреитол (ДТТ), β -меркаптоэтанол, реактив Элмана, гидрохлорид гидроксиламина, цианоборгидрид натрия, трис(2-карбоксиил)фосфингидрохлорид (ТСЕР-НСl) или их комбинации. В некоторых конкретных вариантах реализации изобретения обработка может дополнительно включать в себя алкилирование. В некоторых других конкретных типовых вариантах реализации изобретения обработка может включать в себя алкилирование сульфгидрильных групп белка.

[0077] В контексте настоящего документа термин «обработка» или «изотопное мечение» может относиться к химическому мечению белка. Неограничивающие примеры способов химического мечения белка включают в себя изобарические метки для относительного и абсолютного количественного определения (iTRAQ) с использованием реагентов, таких как 4-плекс, 6-плекс и 8-плекс; восстановительное деметилирование аминов, карбамилирование аминов, ^{18}O -мечение на С-конце белка или любой amino- или сульфгидрильной группы белка для мечения аминов или сульфгидрильной группы.

[0078] В контексте настоящего документа термин «расщепление» относится к гидролизу одной или более пептидных связей белка. Существует несколько подходов к осуществлению расщепления белка в образце с использованием подходящего гидролизующего агента, например ферментативное расщепление или неферментативное расщепление.

[0079] В контексте настоящего документа термин «гидролизующий агент» относится к любому одному или комбинации большого количества различных агентов, которые могут осуществлять расщепление белка. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают в себя трипсин, эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C, протеазу T внешней мембраны (OmpT), фермент, расщепляющий иммуноглобулин, *Streptococcus pyogenes* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназу и протеазу из *Aspergillus Saitoi*. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают в себя использование высокой температуры, микроволны, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения, растворителей (неограничивающие примеры включают в себя этанол и ацетонитрил), расщепление иммобилизованных ферментов (IMER), ферменты, иммобилизованные магнитными частицами, и ферменты, иммобилизованные на кристалле. Недавний обзор, в котором обсуждаются доступные методы расщепления белков, см. в Switazar et al., «Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments» (J. Proteome Research 2013, 12, 1067-1077). Один гидролизующий агент или комбинация гидролизующих агентов могут расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде специфичным для последовательности способом, создавая прогнозируемую совокупность более коротких пептидов.

Типовые варианты реализации изобретения

[0080] В раскрытых в настоящем документе вариантах реализации изобретения предложены способы идентификации по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта в образце, содержащем представляющий интерес белок.

[0081] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения в настоящем изобретении предложен способ идентификации по меньшей мере одного связанного с продуктом

варианта в образце, содержащем представляющий интерес белок, приведения в контакт образца, содержащего представляющий интерес белок, и по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта с условиями конкурентного связывания, при этом условия связывания обеспечивают недостаточный антиген, иммобилизованный на гранулах, и при этом указанный по меньшей мере один связанный с продуктом вариант нарушает связывание с указанным недостаточным антигеном; инкубирование указанного образца с указанным недостаточным антигеном; сбор проточного продукта в результате промывания после инкубации; и идентификацию по меньшей мере одного из связанных с

продуктом критических показателей качества в указанном проточном продукте с использованием масс-спектрометра с жидкостной хроматографией.

[0082] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения связанный с продуктом вариант представляет собой одно или более из усеченных форм, модифицированных форм и агрегатов представляющего интерес белка.

[0083] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения связанный с продуктом вариант представляет собой дезамидированную, изомеризованную, несовпадающую S-S-связанную, окисленную и/или измененную конъюгированную форму (например, гликозилирование, фосфорилирование) представляющего интерес белка.

[0084] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения связанный с продуктом вариант представляет собой посттрансляционно модифицированную форму.

[0085] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения связанный с продуктом вариант имеет нарушенную аффинность связывания, при этом нарушенная аффинность связывания составляет около 90% аффинности связывания представляющего интерес белка, около 80% аффинности связывания представляющего интерес белка, около 70% аффинности связывания представляющего интерес белка, около 60% аффинности связывания представляющего интерес белка, около 50% аффинности связывания представляющего интерес белка, около 40% аффинности связывания представляющего интерес белка, около 30% аффинности связывания представляющего интерес белка, около 20% аффинности связывания представляющего интерес белка или около 10% аффинности связывания представляющего интерес белка.

[0086] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр может представлять собой масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

[0087] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением можно использовать в нативных условиях.

[0088] Следует понимать, что указанные способы не ограничиваются чем-либо из вышеуказанного белка, примеси и колонки и что способы идентификации или количественного определения можно осуществлять любым подходящим образом.

[0089] Один типовой вариант реализации изобретения проиллюстрирован на ФИГ. 3А и 3В. К образцу, содержащему представляющий интерес белок и, возможно, его варианты, можно добавить гранулы с иммобилизованным антигеном. Количество гранул с иммобилизованным антигеном таково, что не весь представляющий интерес белок (нативное МАт) и его варианты могут с ним связываться. Любой вариант с пониженной аффинностью связывания с антигеном будет иметь меньшую вероятность связывания из-за ограниченного количества присутствующего антигена. Проточный продукт фракцию (несвязанную фракцию) можно собирать и анализировать с использованием SCX-МС или пептидного картирования. Контроль (т. е. образец без стадии анализа связывания иммобилизованного антигена) также можно анализировать с использованием SCX-МС или пептидного картирования. Сравнительное исследование между проточным продуктом и контролем может привести к получению хроматограммы, проиллюстрированной на

ФИГ. 3В. Любой вариант с пониженной аффинностью связывания будет иметь большее содержание в проточном продукте. При сравнении количества идентифицированного варианта как такового можно видеть, что относительное процентное содержание варианта больше в проточном продукте, чем в контроле, ввиду его пониженной аффинности связывания. [0090] Такой эксперимент может быть разработан с использованием рабочего процесса, показанного на ФИГ. 4 и ФИГ. 5.

[0091] Для настоящего изобретения очень важно соотношение между представляющими интерес антигеном и белком. Количество добавляемого антигена может быть таким, что от

около 25% до около 75% представляющего интерес белка может связываться с антигеном. В некоторых вариантах реализации изобретения количество добавляемого антигена может быть таким, что около 50% представляющего интерес белка может связываться с антигеном.

[0092] Последовательное обозначение стадий способа, предложенное в настоящем документе, цифрами и/или буквами не предназначено для ограничения способа или любых его вариантов реализации конкретным указанным порядком.

[0093] В описании приведены различные публикации, включая патенты, заявки на патент, опубликованные заявки на патент, учетные номера, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих приведенных ссылок включена в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте и для всех целей.

[0094] Настоящее изобретение можно лучше понять со ссылкой на следующие примеры, которые представлены для более подробного описания изобретения. Они предназначены для иллюстрации примеров и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0095] **Материалы.** Деионизированную воду получали с помощью встроенной системы очистки воды Milli-Q, оснащенной фильтром MilliPak Express 20 (Millipore Sigma, Берлингтон, Массачусетс). МАТ1, МАТ2, антиген МАТ1 и антиген МАТ2 были получены самостоятельно компанией Regeneron (Тэрритаун, Нью-Йорк).

Онлайн-анализ nSCX-УФ/МС.

[0096] Хроматографию с сильным катионным обменом выполняли с использованием прибора YMC BioPro SP-F (YMC, Япония). Для разделения образцов в качестве подвижных фаз использовали 20 мМ ацетата аммония, рН 5,6 (подвижная фаза А) и 150 мМ ацетата аммония, рН 7,4 (подвижная фаза В). Линейный градиент рН использовали для элюирования вариантов заряда МАТ1 с обнаружением при 280 нм.

[0097] Перед вводом образца температура в колоночном отделении была установлена на уровне 45 °С, и колонка с сильным катионным обменом (100 мм, 4,6 мм, 5 мкм) (YMC, Япония) предварительно кондиционировали подвижной фазой А (20 мМ ацетата аммония, рН доводили до 5,6 с 20 мМ уксусной кислоты) при скорости потока 0,4 мл/мин. После ввода аликвоты (10 мкг) образцов белка градиент поддерживают на уровне

100% подвижной фазы А в течение 2 минут с последующим линейным увеличением до 100% подвижной фазы В (150 мМ ацетата аммония, рН 7,4) через 16 минут. Градиент поддерживался на уровне 100% подвижной фазы В в течение 4 минут, а затем возвращался к 100% подвижной фазы А для восстановления состояния колонки в течение 7 минут до следующего ввода. Пики при относительном времени пребывания раньше или позже основного пика идентифицируют с использованием онлайн-МС.

[0098] Для масс-спектрометрического анализа разрешение было установлено на уровне 17 500, напряжение капиллярного распыления было установлено на уровне 1,5 кВ, энергия фрагментации в источнике была установлена на 100, энергия соударения была установлена на 10, температура капилляров была установлена на уровне 350 °С, РЧ-уровень S-линзы был установлен на 200, а давление улавливающего газа HCD было установлено на 3. Масс-спектры были получены с окном диапазона m/z от 2000 до 15 000.

[0099] **Анализ данных.** Программное обеспечение Protein Metrics Intact Mass использовали для деконволюции необработанных данных. Браузер Thermo Xcalibur Qual использовали для анализа экстрагированной ионной хроматограммы.

Пример 1.

1.1 Оптимизация анализа конкурентного связывания

[0100] Был разработан анализ конкурентного связывания для дифференциации вариантов представляющего интерес белка с нарушенным связыванием. mAt1 использовали в качестве типового представляющего интерес белка.

[0101] Антиген mAt1 биотинилировали с использованием реагента для биотинилирования (30 мин при комнатной температуре, с использованием NHS-биотина). Биотинилированное mAt1 загружали на слой стрептавидина-смолы (биотинсвязывающая способность 7 нмоль, Pierce) в пробирке (micro BioSpin, Bio-Rad). Через пять минут выполняли фильтрацию

центрифугированием и слой геля промывали 100 мМ Трис, рН 7,5 (инкубация около 1 минуты с последующим центрифугированием), а затем шесть раз очищенной водой (Milli-Q, Millipore) с получением смолы, иммобилизованной на антигене.

[0102] Ряд пробирок с одиннадцатью различными увеличивающимися объемами смолы, иммобилизованной на антигене (1-40 мкл), суспендировали в буфере для анализа связывания (буфер для анализа связывания может представлять собой любой, от Трис до фосфатно-солевого буферного раствора (PBS-буфера)). После добавления очищенного mAt1 пробирки инкубировали в течение 1 часа при 4 °С. При центрифугировании, т. е. центрифугировании при 800×g в течение пяти минут при 4 °С, супернатант удаляли и связывание анализировали путем измерения концентрации белка со скоростью потока при 280 нм с использованием спектрофотометра в УФ и видимой области NanoDrop по отношению к общему количеству mAt1. Один типовой вариант реализации полученной кривой титрования показан на ФИГ. 6. Объем смолы, иммобилизованной на антигене, был недостаточным для захвата всего образца mAt1, что обеспечивало проточный продукт, насыщенный для любых вариантов mAt1 с нарушенным связыванием. Объем смолы,

необходимый для получения 50% связывания мАт1, был выбран для дальнейших анализов конкурентного связывания.

[0103] 1.2 Анализ конкурентного связывания nSCX-УФ/МС. Для мАт1 выполняли анализ конкурентного связывания, как описано выше.

[0104] Анализ SCX-УФ мАт1 демонстрирует, что он имеет существенный вариант гликирования, как показано на ФИГ. 7. Специфический сайт гликирования был идентифицирован как лизин (K) 98 тяжелой цепи (HC), как показано в таблице 1. Это гликирование ранее было вовлечено в связывание антигена, но его точное влияние было неизвестно. **Таблица 1.**

ПТМ	Местоположение сайта ^a	Пептидная последовательность	Процентное содержание ПТМ (%)
Дезамидирование аспарагина	HC Asn ⁸⁴	(K)NSLFLQMNSLR(A)	1,1%
	HC Asn ³¹¹ /HC* Asn ³¹⁸	(R)VVSVLTVLHQDWLN GK(E)	2,5%
	HC Asn ³⁸⁰ /HC* Asn ³⁸⁷	(K)GFYPSDIAVEWESN GQPENNYK(T)	4,0%
Окисление метионина	HC Met ²⁴⁸ /HC* Met ²⁵⁵	(K)DTLMISR(T)	3,7%
	HC Met ⁴²⁴	(R)WQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQK(S)	1,2%
	HC* Met ⁴³¹	(R)WQEGNVFSCSVMHE ALHNR(F)	1,4%
Гликирование лизина	HC Lys ⁹⁸	(E)DTAVYFCVK(D)	31,7%
Глюкуронилирование лизина			4,3%
Карбоксиметилирование лизина			1,0%
Модификация лизина +161,01 Да			1,3%

[0105] Для определения того, влияют ли какие-либо основные варианты мАт1, такие как гликирование, на связывание антигена, проточный продукт мАт1, полученный в результате анализа конкурентного связывания, сравнивали с контрольным образцом мАт1 с использованием анализа SCX-УФ. Контрольный эксперимент включал в себя использование SCX-УФ/МС для мАт1, полученного в результате исследования стабильности, без какой-либо стадии насыщения. Сравнение двух хроматограмм показано

на ФИГ. 8. На ФИГ. 8 ясно показано насыщение пика гликирования мАт1 в проточном продукте из анализа конкурентного связывания по сравнению с контрольным мАт1. Это демонстрирует, что модификация гликирования действительно ухудшает связывание мАт1 с антигеном мАт1 и, следовательно, представляет собой CQA, который следует учитывать при разработке препарата.

[0106] 1.3 Оценка нескольких критических показателей качества с использованием SCX-МС с конкурентным связыванием Образцы из примера 1.2 дополнительно подвергали анализу масс-спектрометрии. Экстрагированные ионные хроматограммы (ХИС) по контрольному образцу мАт1 и проточному продукту мАт1 в анализе конкурентного связывания показаны на ФИГ. 9. В сравниваемых ХИС можно идентифицировать несколько вариантов белка, что демонстрирует, что способ по изобретению способен одновременно идентифицировать несколько CQA, которые отрицательно влияют на связывание белка. В то же время ПТМ, относительное содержание которых не меняется от образца к образцу, можно не рассматривать как CQA.

[0107] Статистический анализ насыщения ПТМ в проточном продукте анализа конкурентного связывания по сравнению с контрольным образцом показан на ФИГ. 10. Из указанного сравнения видно, что некоторые модификации (такие как гликирование НС К98, карбоксиметилирование НС К98 (CML) и глюкуронилирование НС К98) были насыщены с использованием эксперимента анализа конкурентного связывания, что идентифицирует их как CQA для мАт1, тогда как другие (Q- и концевое галактозилирование N-концов Fc-гликана) не были насыщены. Таким образом, данный способ успешно идентифицировал критические показатели качества и связанные с продуктом варианты, которые вызывают снижение связывания мАт1 с антигеном мАт1, и отличал их от модификаций, которые не влияют на связывание и, следовательно, могут не учитываться при разработке продукта.

Пример 2.

2.1 Анализ SCX-МС с конкурентным связыванием биспецифического антитела

[0108] Эффективность способа по изобретению была дополнительно продемонстрирована анализом биспецифического антитела бсАт1. Структура бсАт1 показана на ФИГ. 11. На ФИГ. 11 показано, что мАт2 содержит две отдельные области НС, НС и НС*.

[0109] Предыдущий анализ nSCX-МС партий бсАт1 показал, что оно явно содержит вариант дезамидирования. Предыдущий анализ пептидного картирования определил основной вариант, вызванный дезамидированием НС N56, как показано в таблице 2.

Таблица 2.

Местонахождение сайта	Пептидная последовательность	Название ПТМ	t0 в платформе		Платформа, pH6, 45C28d	
			Мод	Всего	Мод	Всего

			(%)	(%)	(%)	(%)
HC Gln1	<u>Q</u> VQLVESGGGWQPGR	Q1>пиро-Glu	94,2	94,2	99,6	99,6
HC Met34	LSCAASGFTFSSYGM <u>H</u> WVR	Окисление M34	0,2	0,2	0,2	0,2
HC Asn56	GLEWVAVISYAG <u>N</u> NK	Дезамидирование N56	15,1	15,1	30,4	30,4
HC Asp99	<u>D</u> SYDFLTPDVLDIW GQGT <u>M</u> VTVSSASTK	Дегидратация D99	0,2	0,2	1,9	1,9
HC Met119	DSYYDFLTPDVLDIW GQGT <u>M</u> VTVSSASTK	Окисление M119	3,4	3,4	9,3	9,3
HC Met255/HC * Met255	DTL <u>M</u> ISR	Окисление M255	5,2	5,2	8,7	8,7

[0110] HC N56 расположена в определяющей комплементарности области (CDR) бсАт1, что повышает вероятность того, что она может отрицательно влиять на связывание бсАт1 с его мишенью. Для определения любого потенциального влияния вариантов бсАт1 на связывание, бсАт1 подвергали анализу SCX-МС с конкурентным связыванием. **[0111]** Смола, иммобилизованная на антигене, была оптимизирована и приготовлена, как описано в примере 1.1. бсАт1 подвергали анализу конкурентного связывания, и проточный продукт, полученный в результате анализа конкурентного связывания, сравнивали с контрольным образцом бсАт1 с использованием SCX-УФ/МС. Сравнение двух УФ-хроматограмм показано на ФИГ. 12. На ФИГ. 12 ясно показано насыщение варианта дезамидирования бсАт1 в проточном продукте в результате анализа конкурентного связывания, которое количественно определяют, как показано на ФИГ. 13. Насыщение варианта дезамидирования бсАт1 в проточном продукте в результате анализа конкурентного связывания демонстрирует, что дезамидирование представляет собой CQA при получении бсАт1. **[0112] 2.2 Оценка нескольких критических показателей качества с использованием SCX-МС с конкурентным связыванием.** бсАт1 подвергали дополнительному анализу с использованием МС картирования SCX-пептида с конкурентным связыванием. Экстрагированные ионные хроматограммы (ХИС) контрольного эксперимента и проточного продукта анализа конкурентного связывания показали несколько разных ПТМ. Сравнительный анализ количества вариантов, полученных с использованием контрольного эксперимента и эксперимента анализа конкурентному связыванию, показан на ФИГ. 14. Из сравнения вариантов ясно, что только вариант дезамидирования N56 был насыщен с использованием эксперимента анализа конкурентного связывания и, таким образом, вероятно, был единственным идентифицированным критическим показателем качества или связанным с продуктом вариантом бсАт1 с пониженной аффинностью связывания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения характеристик по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта, включающий:

получение образца, содержащего представляющий интерес белок и по меньшей мере один связанный с продуктом вариант указанного представляющего интерес белка;

приведение указанного образца в контакт с условиями конкурентного связывания, включая недостаточную мишень, иммобилизованную на гранулах;

промывание указанных гранул для сбора проточного продукта;

подвержение указанного проточного продукта анализу жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией для разделения указанного представляющего интерес белка и указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта; и

сравнение содержания указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта со стадией (d) с содержанием указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта, полученного в результате анализа жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией контрольного образца со стадии (a), для определения характеристик указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что жидкостная хроматография представляет собой хроматографию с сильным катионным обменом.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные гранулы представляют собой агарозные гранулы или магнитные гранулы.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный проточный продукт насыщен для указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный проточный продукт со стадии (c) собирают путем выполнения центрифугирования.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий подвержение указанного проточного продукта со стадии (c) условиям расщепления до анализа жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные гранулы покрыты стрептавидиновой смолой.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная недостаточная мишень включает количество указанной мишени, способное связывать от около 30% до около 80% указанного представляющего интерес белка.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный образец со стадии (b) инкубируют в течение около одного часа.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный образец со стадии (b) инкубируют примерно при комнатной температуре.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный связанный с продуктом вариант содержит вариант размера.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанный вариант размера представляет собой вариант фрагментации указанного представляющего интерес белка.

13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанный вариант размера представляет собой вариант агрегации указанного представляющего интерес белка.

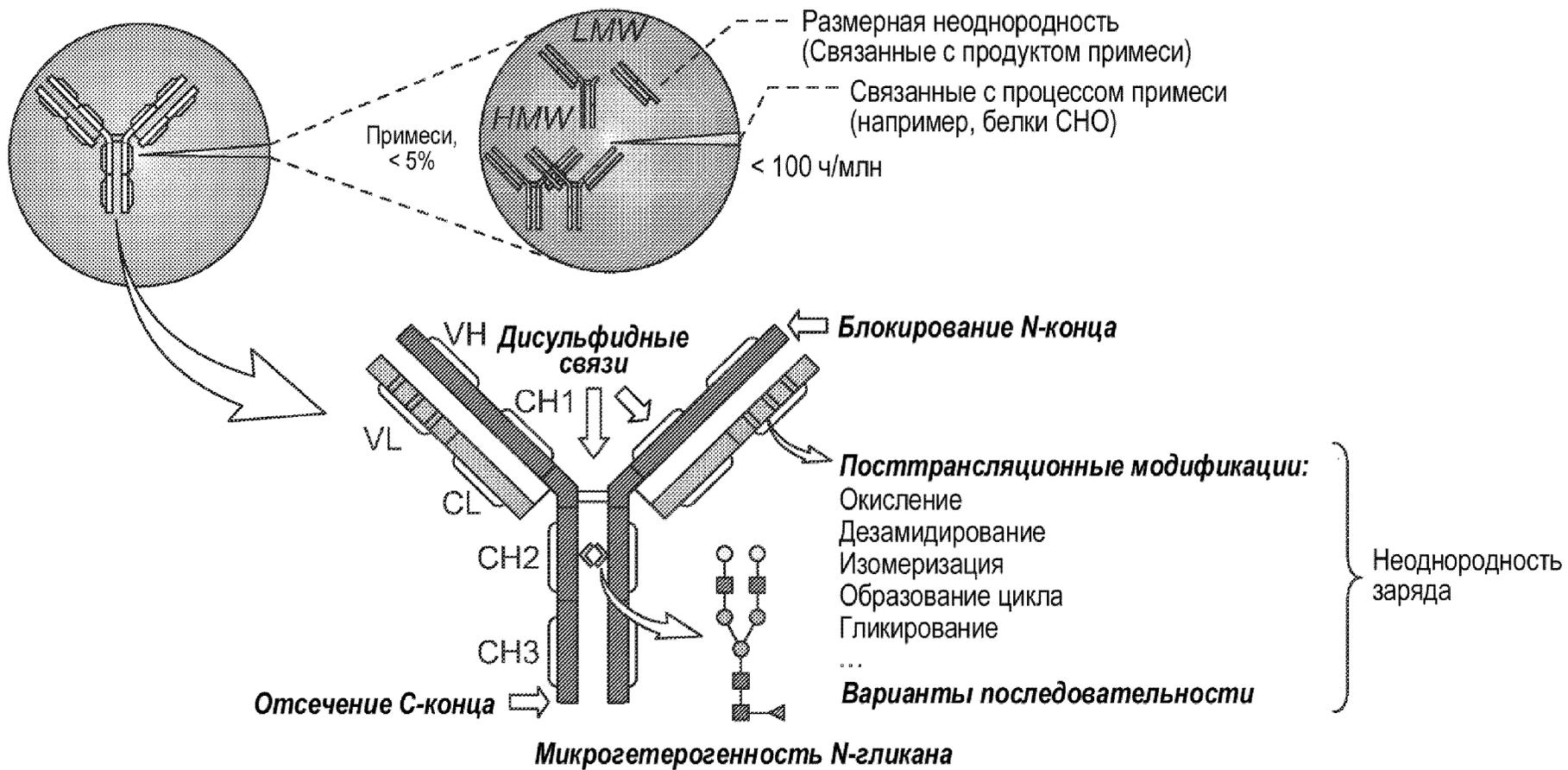
14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный связанный с продуктом вариант включает вариант заряда указанного представляющего интерес белка.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный связанный с продуктом вариант включает посттрансляционно модифицированный вариант указанного представляющего интерес белка.

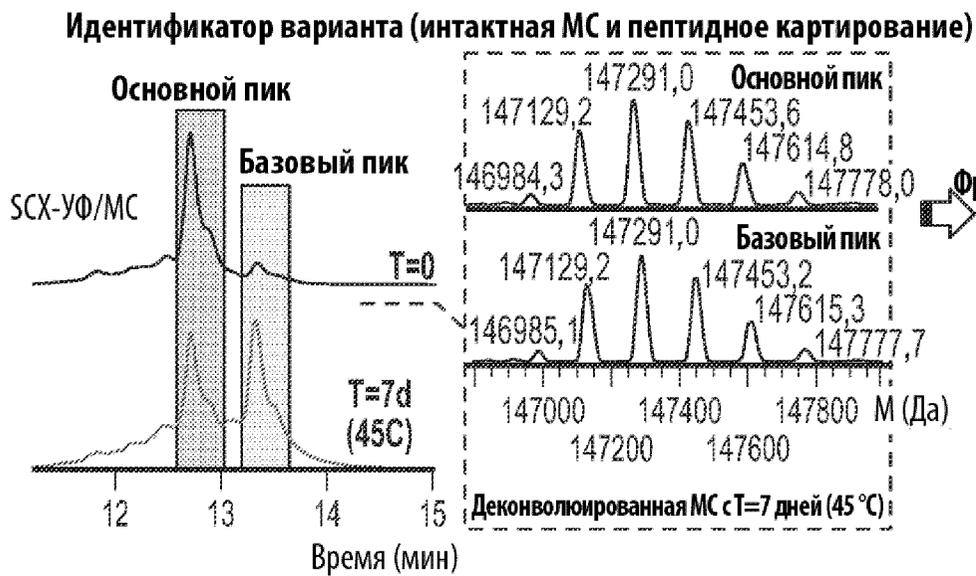
16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная мишень представляет собой антиген, направленный к указанному представляющему интерес белку.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный связанный с продуктом вариант характеризуют как критический показатель качества, если указанное содержание указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта со стадии (d) значительно превышает указанное содержание указанного по меньшей мере одного связанного с продуктом варианта, полученного в результате анализа жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией контрольного образца со стадии (a).

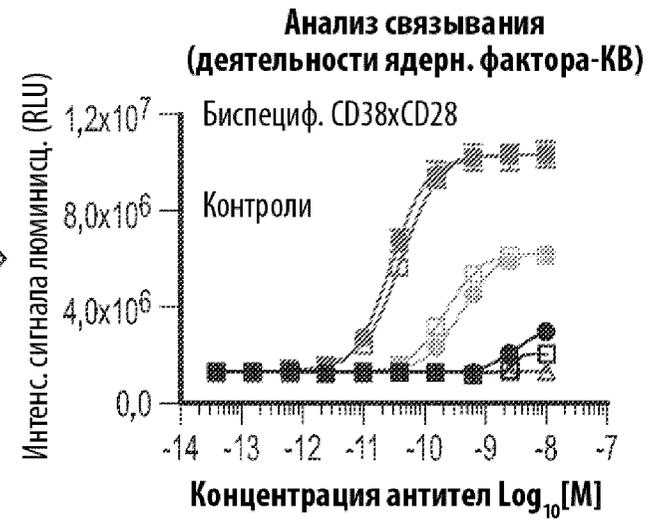
По доверенности



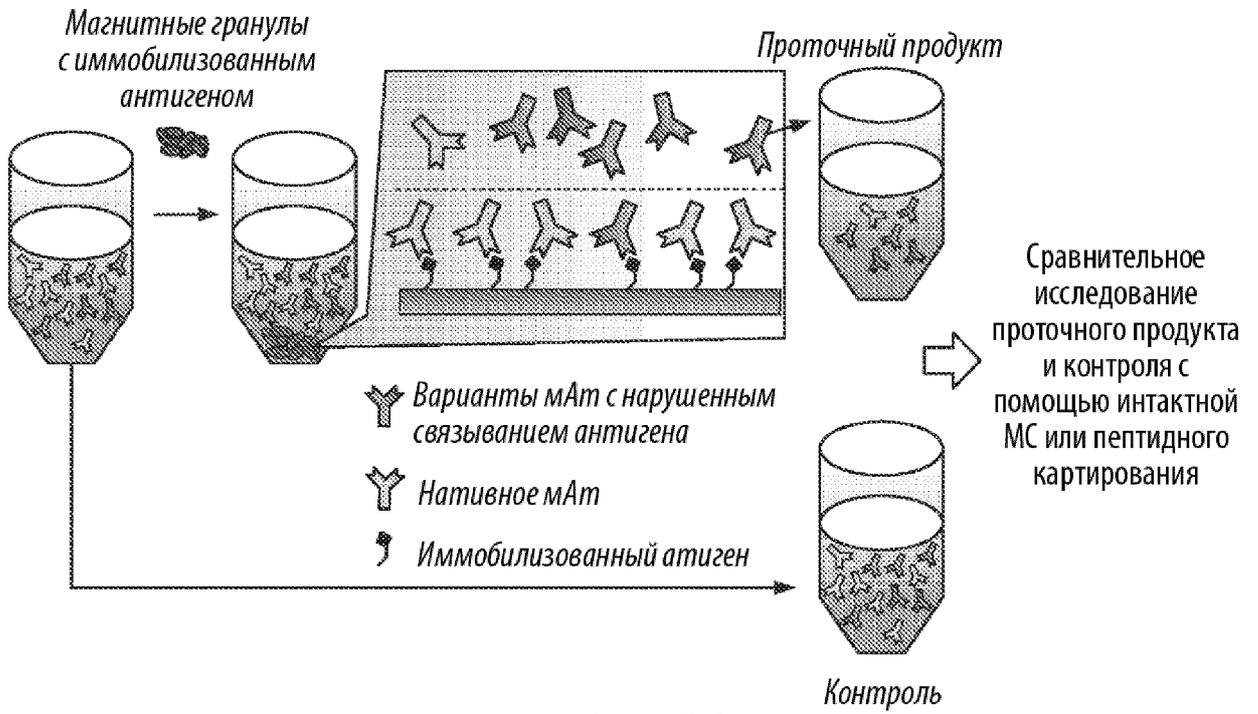
Фиг. 1



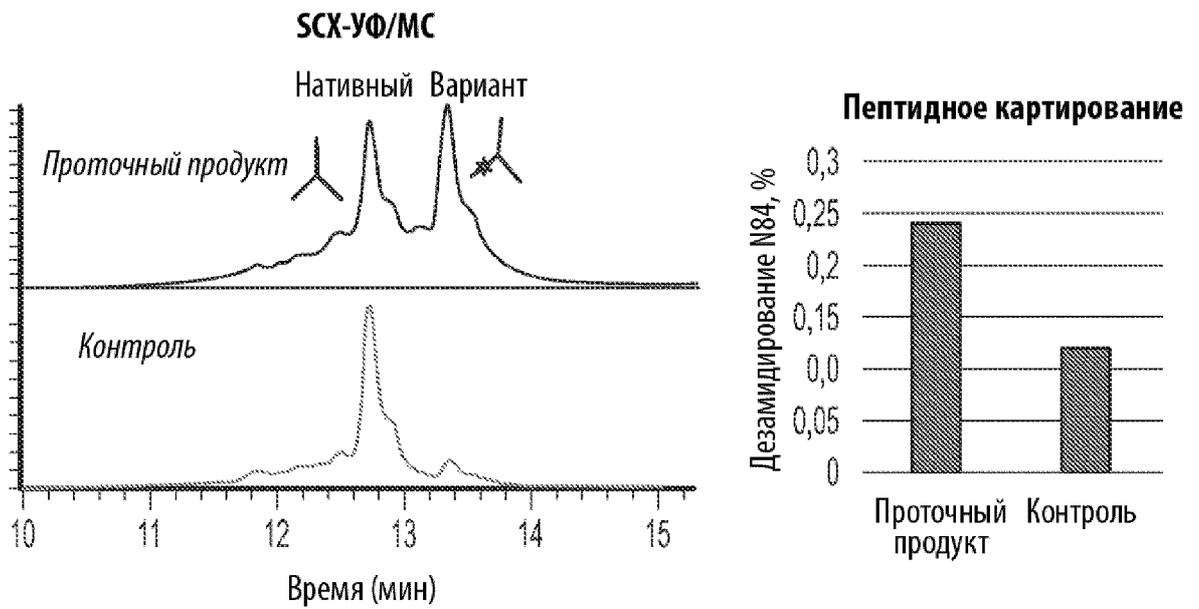
Фракционирование/
стресс



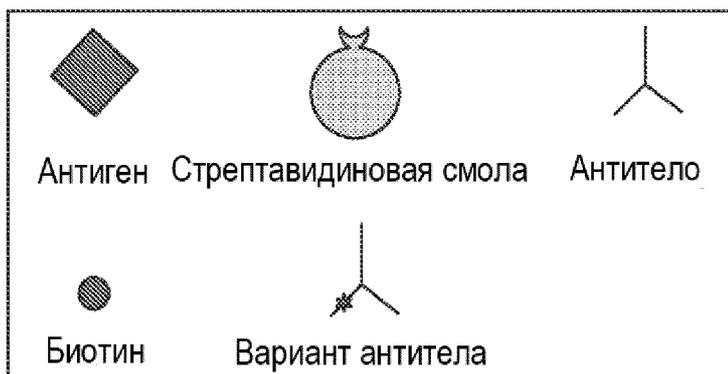
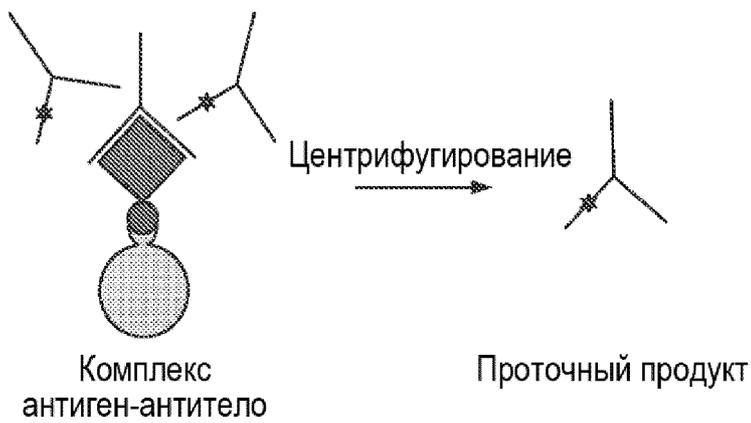
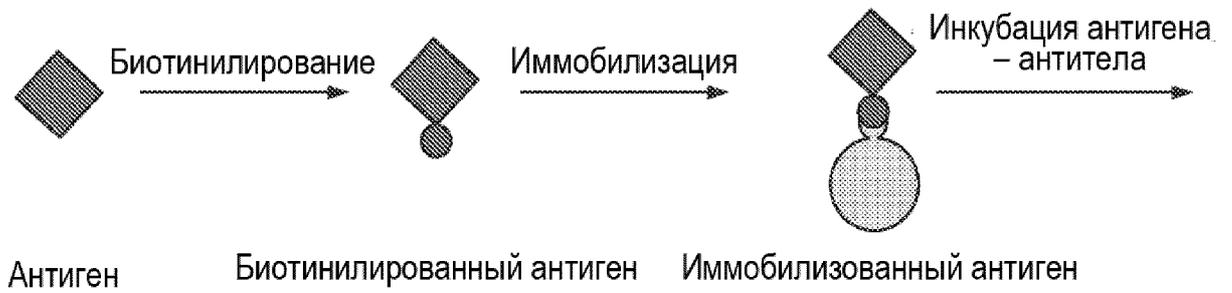
Фиг. 2



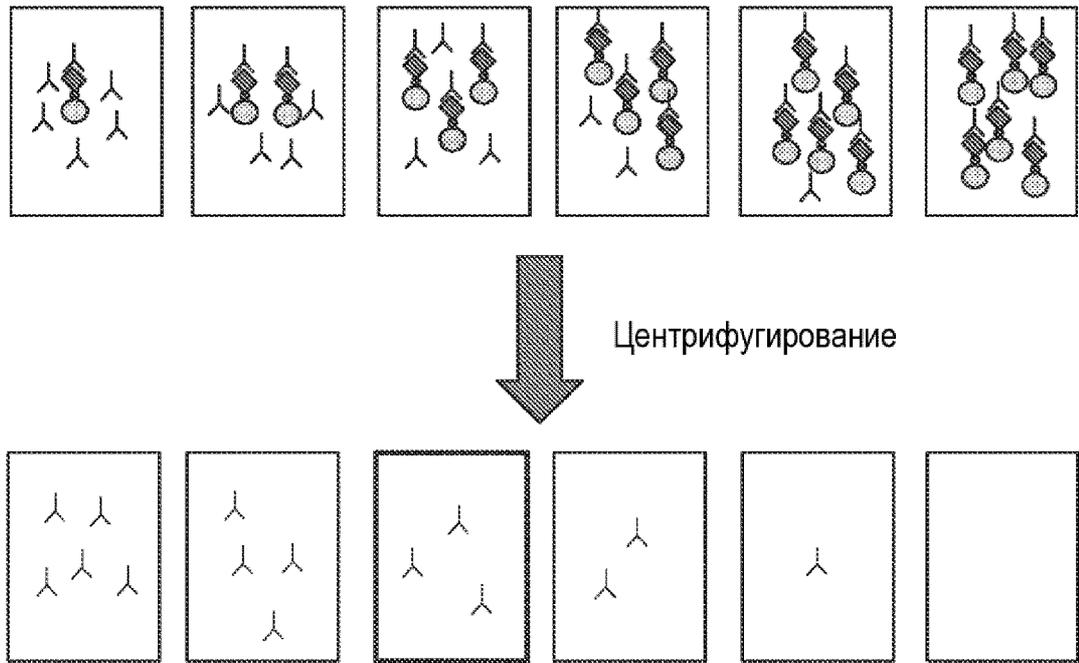
Фиг. 3А



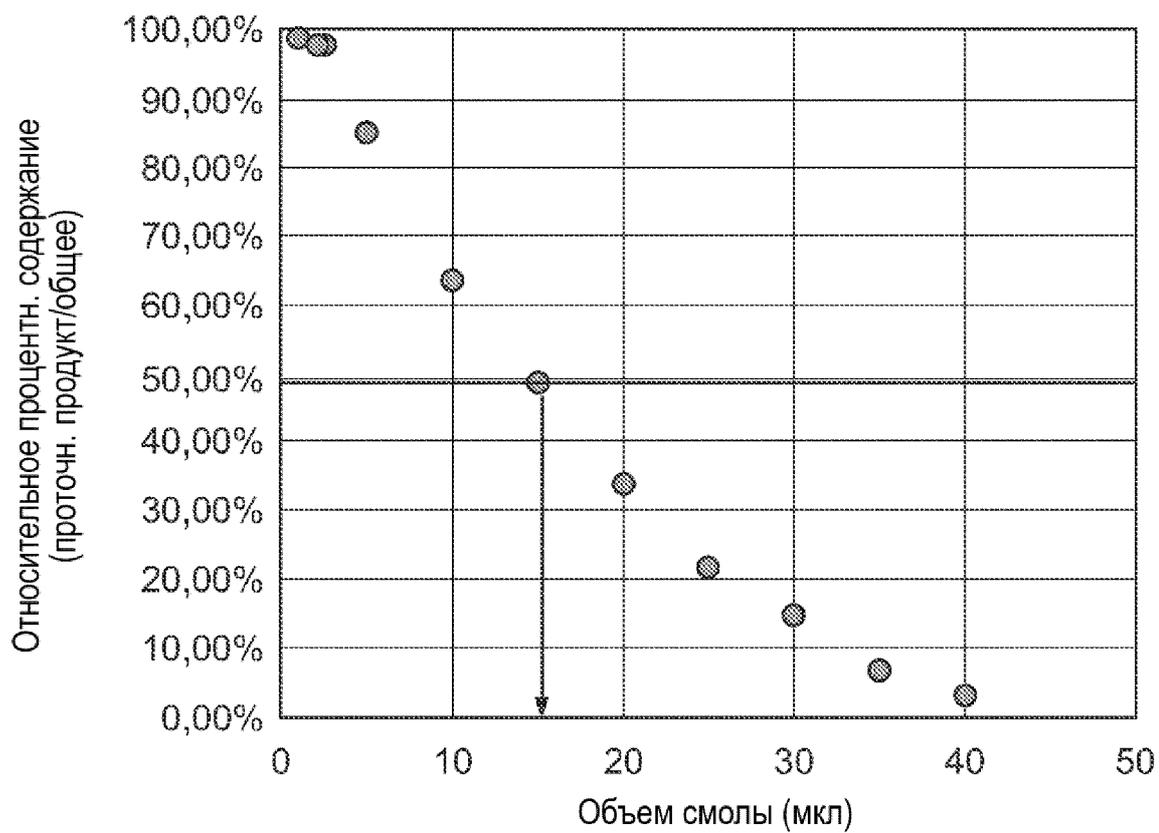
Фиг. 3В



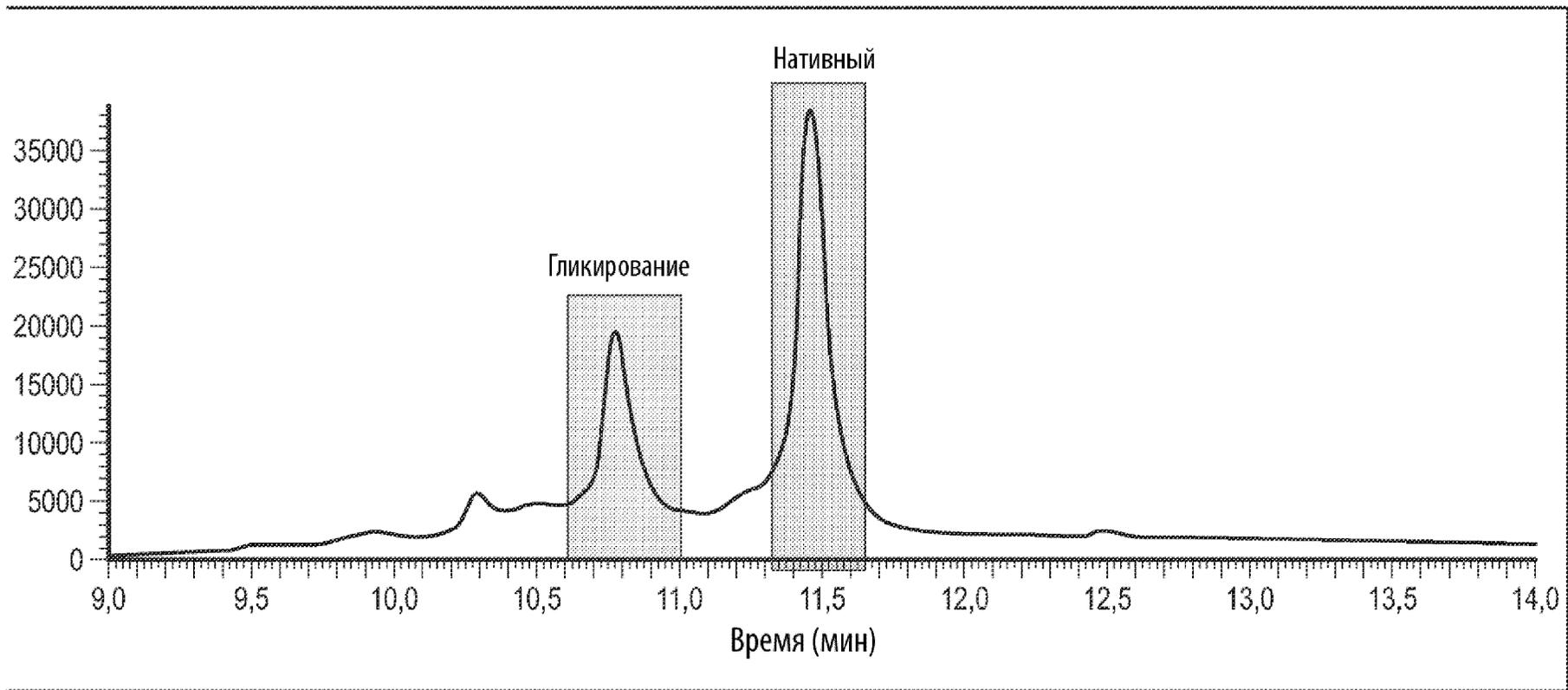
Фиг. 4



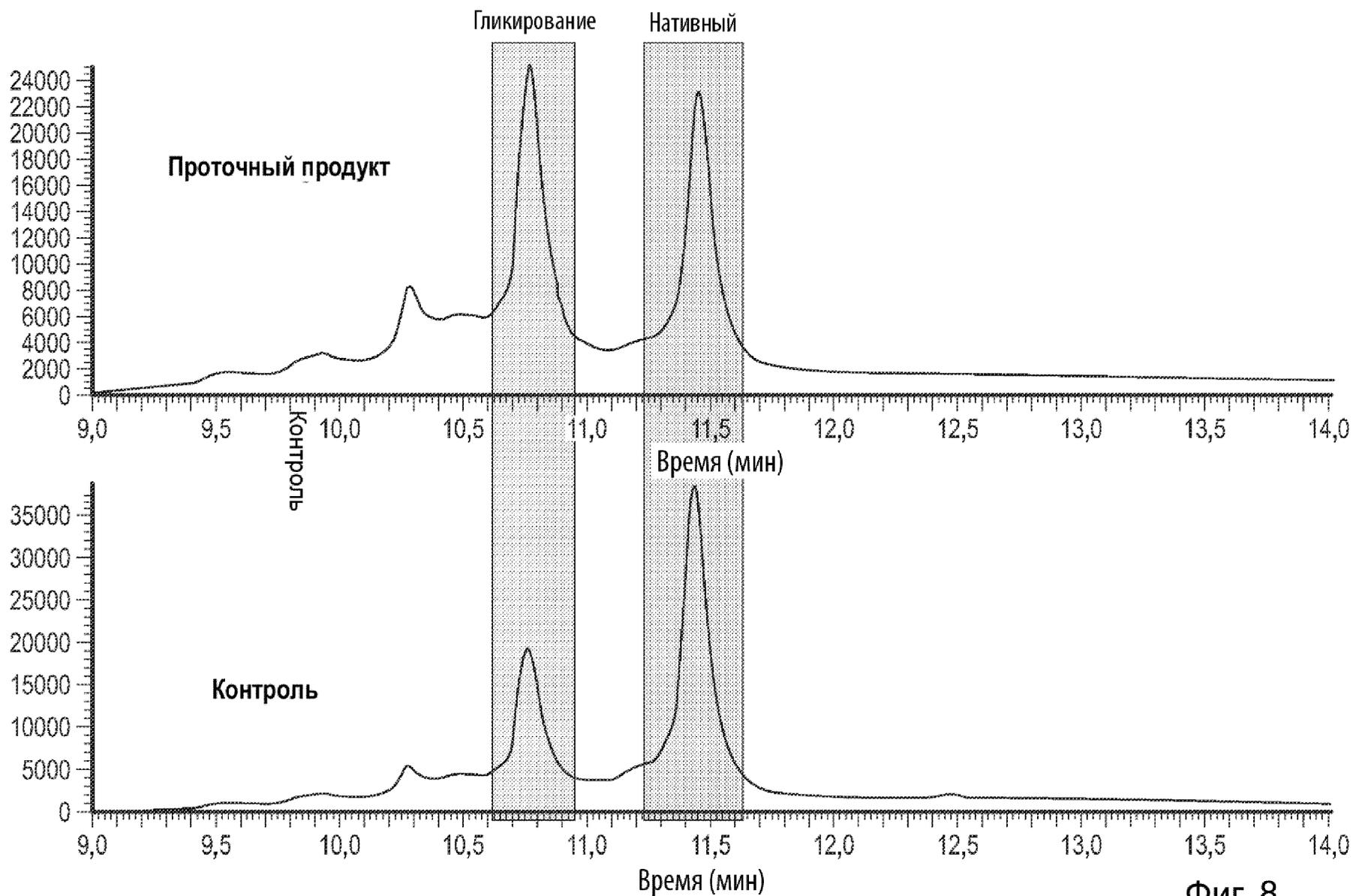
Фиг. 5

Кривая титрования антитела по сравнению со смолой с
иммобилизованным антигеном

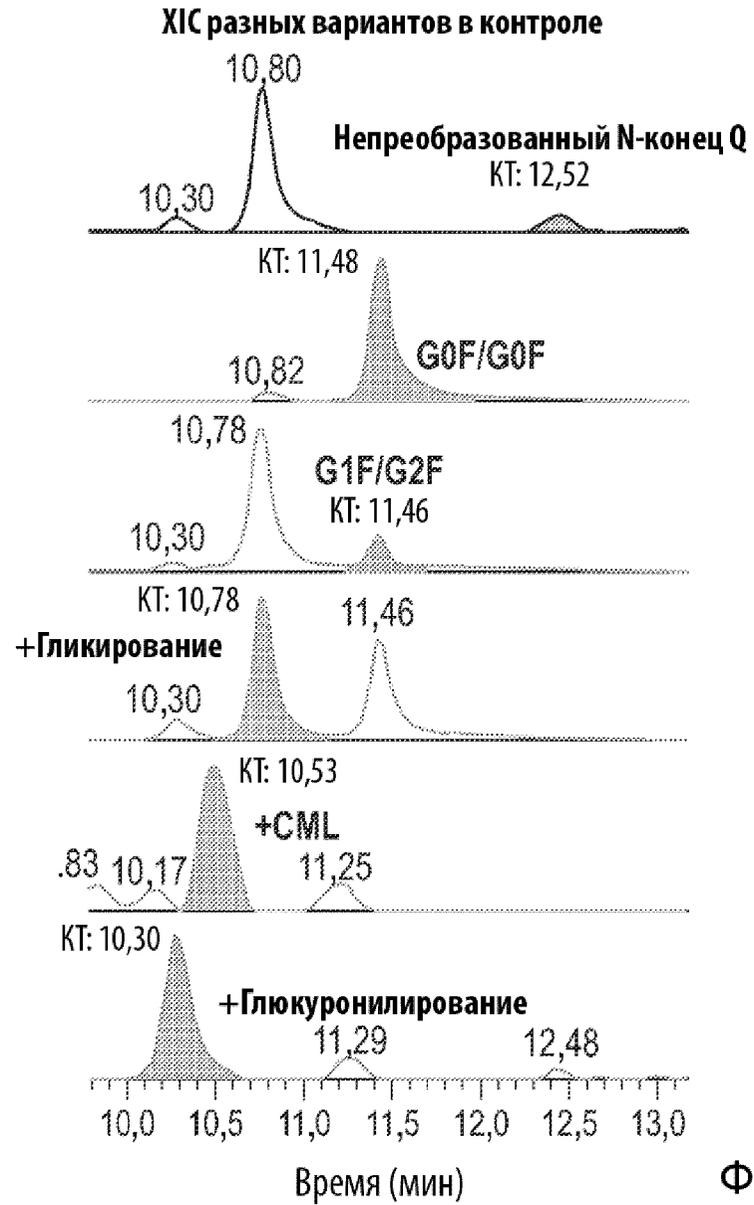
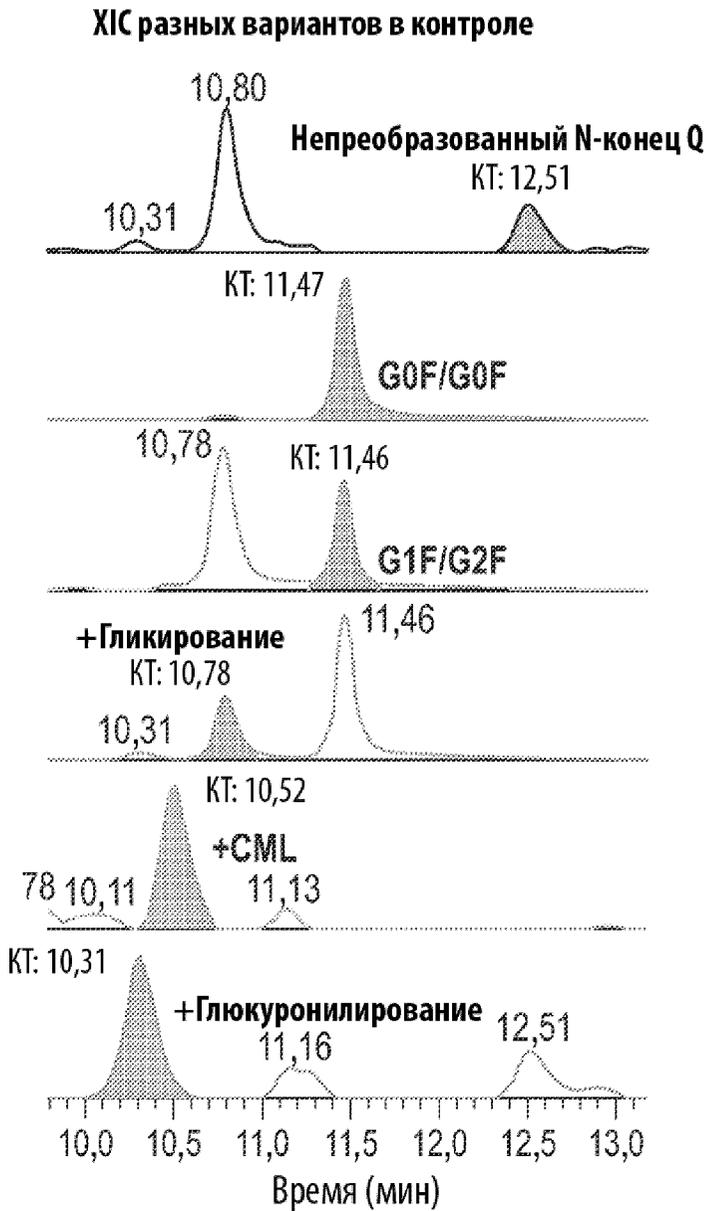
Фиг. 6



Фиг. 7

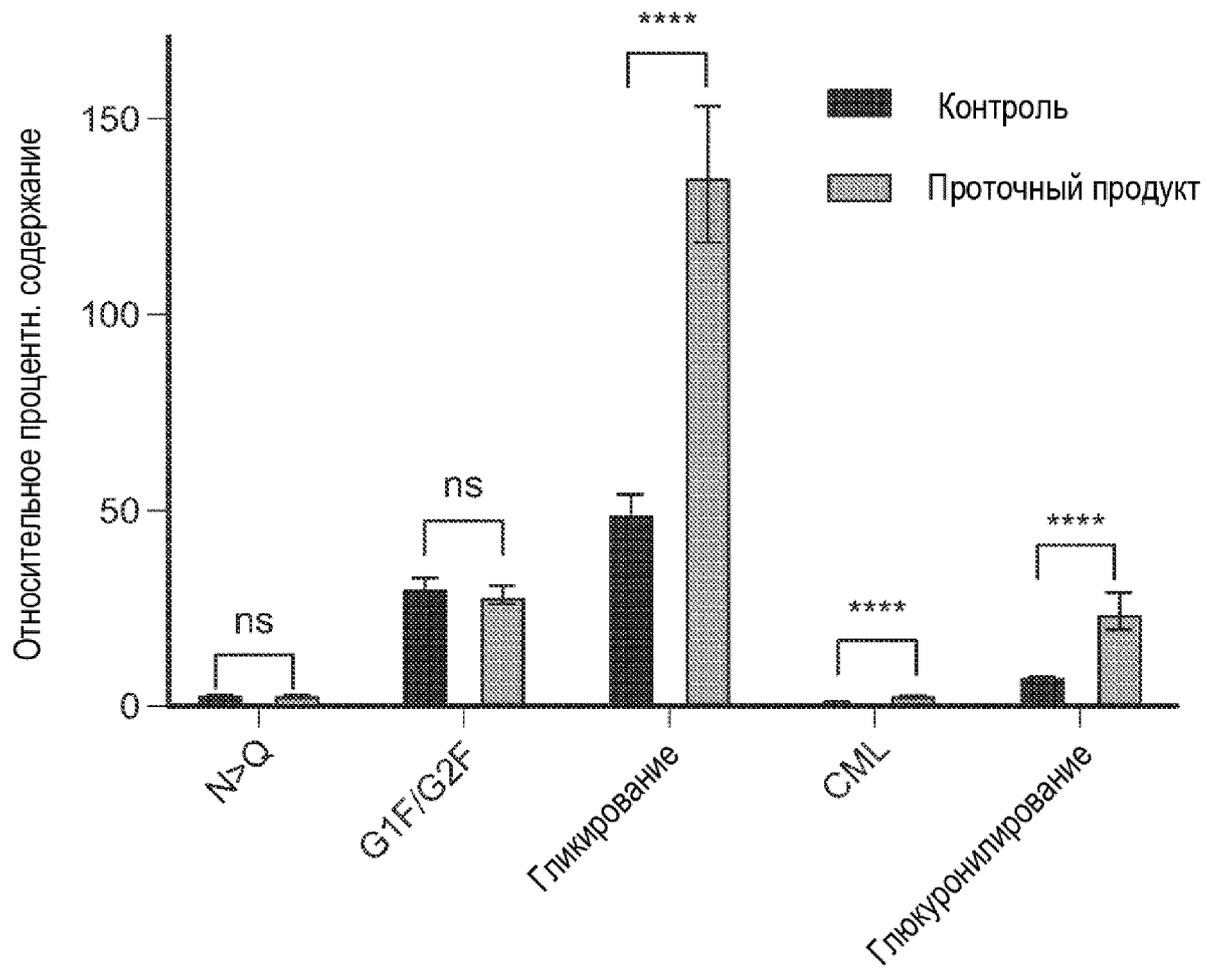


Фиг. 8

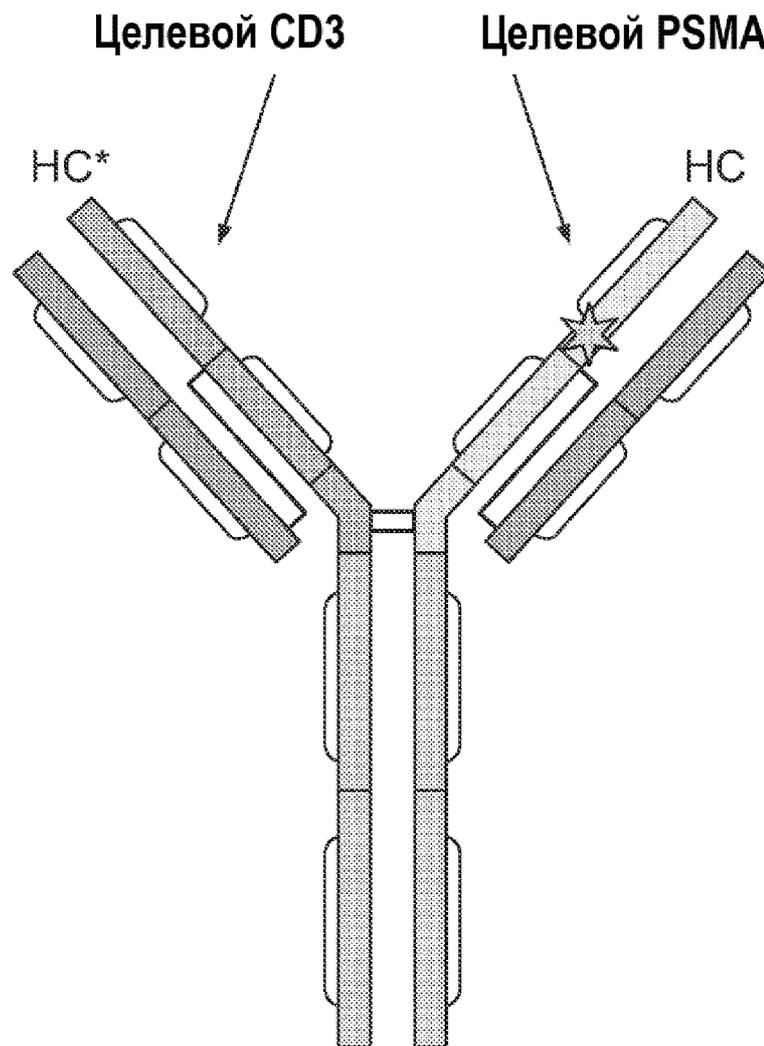


9/14

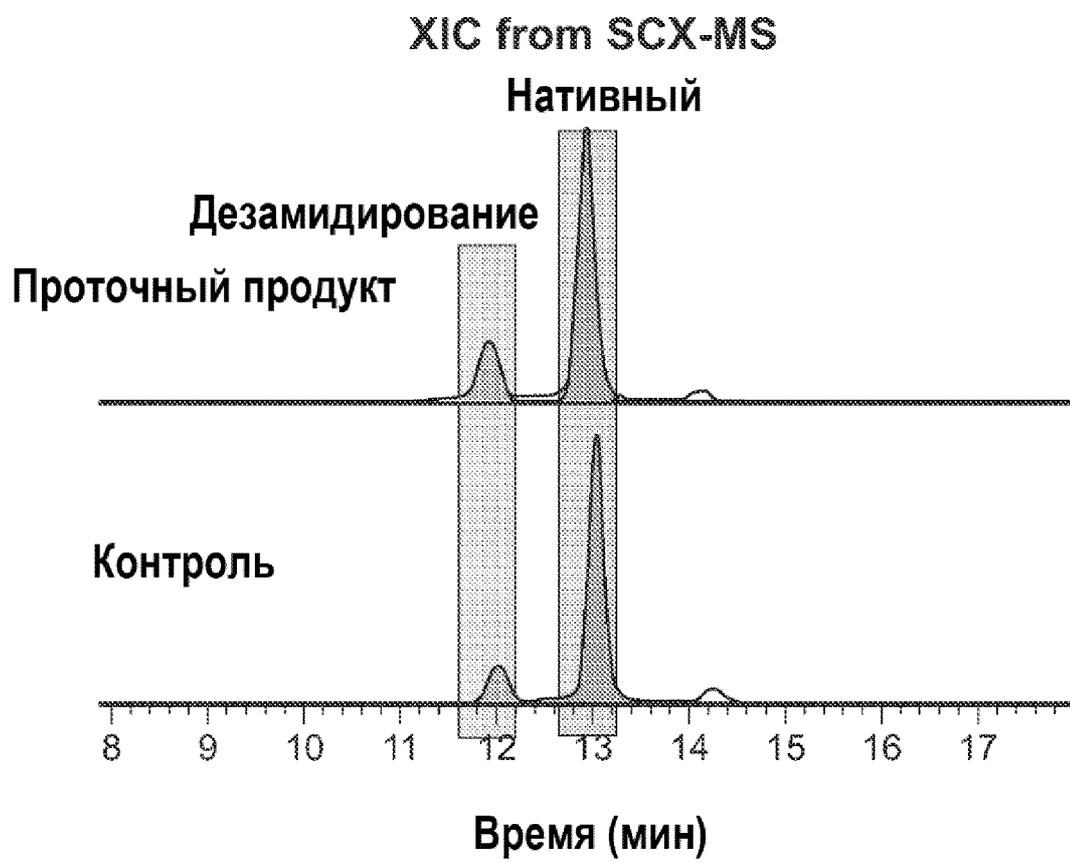
Фиг. 9



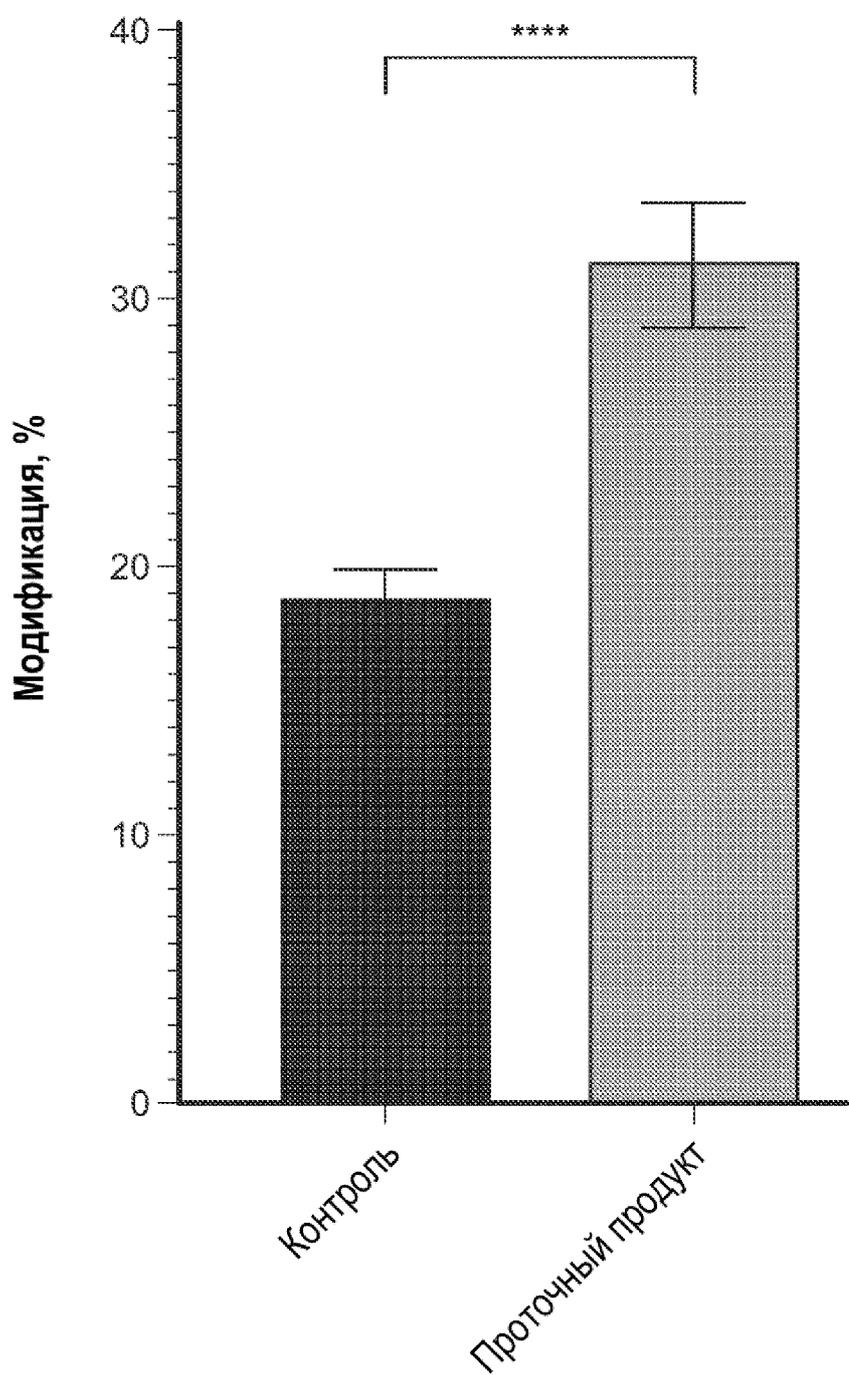
Фиг. 10



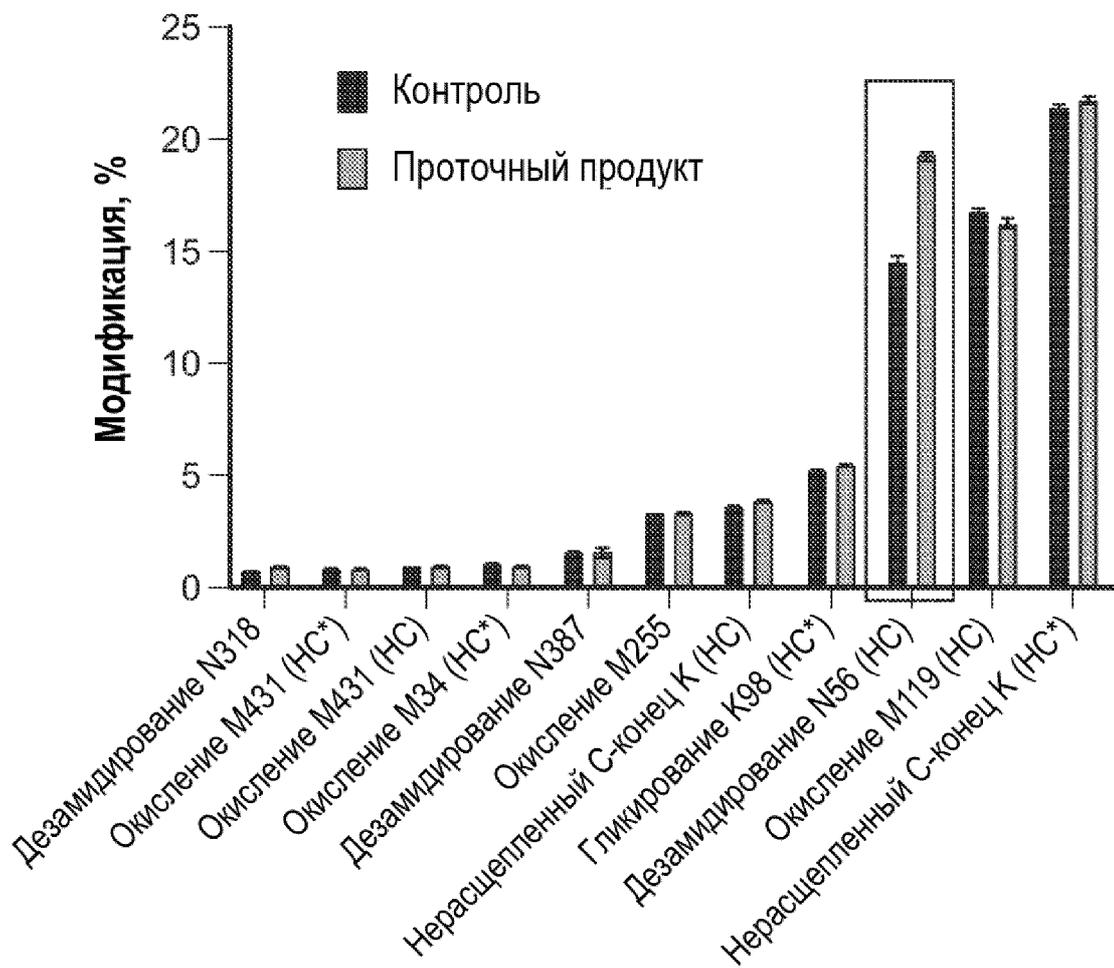
Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14