

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490215 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.14

(51) Int. Cl. G01N 30/96 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.12

(54) ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ АНИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ (АЕХ-МС)

(31) 63/221,447; 63/305,177

(72) Изобретатель:

(32) 2021.07.13; 2022.01.31

Лью Анита, Ванг Шунхай (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/036868

(74) Представитель:

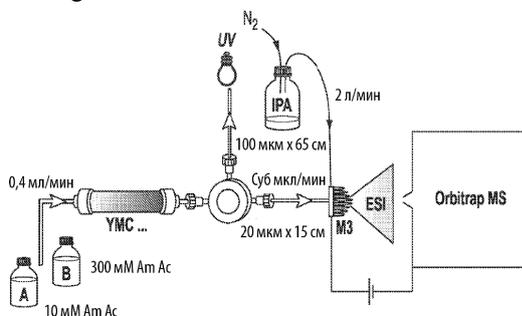
(87) WO 2023/287821 2023.01.19

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) Данное изобретение в целом относится к способам определения характеристик отличающихся зарядом вариантов белка. В частности, данное изобретение относится к применению способов анионообменной хроматографии с масс-спектрометрией (АЕХ-МС) с использованием градиента концентрации соли. Данное изобретение является особенно пригодным для анализа отличающихся зарядом вариантов подклассов IgG4.



A1

202490215

202490215

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580352EA/042

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ АНИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ (AEX-MS)

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Настоящая заявка заявляет приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/221,447, поданной 13 июля 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки. Настоящая заявка также заявляет приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/305,177, поданной 31 января 2022 г., которая также включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[1] Данное изобретение в целом относится к способам определения характеристик отличающихся зарядом вариантов белков с использованием анионообменной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с использованием элюирования возрастающим градиентом концентрации соли.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] Терапевтические белки являются важными лекарственными средствами для лечения рака, аутоиммунного заболевания, инфекции и кардиометаболических нарушений, и они представляют собой один из наиболее быстрорастущих сегментов фармацевтической промышленности. Терапевтические белки должны соответствовать очень высоким стандартам чистоты. Таким образом, может быть важно отслеживать примеси на разных этапах разработки, производства, хранения и манипуляций с лекарственными средствами.

[3] Для белков известно более 600 разных типов посттрансляционных модификаций, многие из которых имеют чрезвычайно низкую распространенность, вызывают тонкие изменения в физико-химических свойствах и представляют собой серьезную проблему для аналитических методов, необходимых для определения их характеристик. Для белков, полученных с использованием рекомбинантных способов, посттрансляционные модификации представляют собой критически важные показатели качества продукта, которые могут влиять на эффективность лекарственного средства и безопасность для пациента, как было показано для моноклональных антител (mAb). Чувствительные в отношении заряда режимы разделения, такие как ионообменная хроматография (ИЕС), капиллярный электрофорез и капиллярное изоэлектрическое фокусирование, обычно используют для разделения и определения характеристик отличающихся зарядом вариантов в виду их высокой селективности, позволяющей разделять варианты белков с минимальной разницей в их свойствах, то есть суммарном поверхностном заряде. Однако способы разделения по заряду в случае интактных белков, как правило, не идеально подходят для сочетания с масс-спектрометрией (MS) из-за

несовместимости буферных систем. Разработанные на сегодняшний день способы, в которых используется сочетание ИЕС с MS, подходят только для белков с изоэлектрической точкой (pI) менее чем около 6,0.

[4] Некоторые терапевтические белки, разработанные на основе IgG1 и IgG4, могут иметь pI более 6,0. Для разработки, очистки и определения характеристик этих белков требуется эффективный аналитический способ. Следует понимать, что в данной области техники имеет место давно назревшая необходимость в эффективном способе определения характеристик отличающихся зарядом вариантов белков независимо от их pI.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Типовые варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, удовлетворяют вышеупомянутым требованиям, предоставляя способы определения характеристик отличающихся зарядом вариантов белка с использованием нативной АЕХ-MS.

[2] Данное изобретение относится к способу определения характеристик таких отличающихся зарядом вариантов белка, представляющего интерес. В одном типовом варианте реализации изобретения способ включает: (a) загрузку образца, содержащего белок, представляющий интерес, и по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант указанного белка, представляющего интерес, в колонку для анионообменной хроматографии (АЕХ); (b) применение возрастающего градиента концентрации соли к загруженной анионообменной колонке для получения элюата; (c) сбор по меньшей мере одной фракции из (b); и (d) подвергание указанной по меньшей мере одной фракции масс-спектрометрическому анализу для определения характеристик указанного по меньшей мере одного отличающегося зарядом варианта указанного белка, представляющего интерес.

[3] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает применение возрастающего градиента концентрации соли к загруженной анионообменной колонке, причем градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 600 мМ соли аммония. В одном конкретном аспекте соль аммония представляет собой ацетат аммония. В другом конкретном аспекте градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 300 мМ соли аммония. В другом конкретном аспекте применяемый возрастающий градиент концентрации соли является линейным.

[4] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает отслеживание элюата из (b) в отношении поглощения ультрафиолета и сбор указанной по меньшей мере одной фракции, которая элюируется до элюирования белка, представляющего интерес. В другом аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает отслеживание элюата из (b) в отношении поглощения ультрафиолета и сбор указанной по меньшей мере одной фракции, которая элюируется после элюирования белка, представляющего интерес.

[5] В одном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, имеет значение pI более чем около 6,2. В конкретном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, имеет значение pI от около 6,2 до около 7,0. В конкретном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, имеет значение pI от около 6,2 до около 8,7.

[6] В одном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой моноклональное антитело на основе IgG4. В другом аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой моноклональное антитело на основе IgG1. В еще одном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой биспецифическое моноклональное антитело.

[7] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает снижение скорости потока из (с) посредством делителя потока до подвергания указанной по меньшей мере одной фракции масс-спектрометрии.

[8] В одном аспекте варианта реализации изобретения указанный по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант может представлять собой либо кислый вариант, либо основной вариант белка, представляющего интерес. Например, кислые варианты могут включать соединения, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования, глюкуронирования, и/или высокомолекулярные соединения белка, представляющего интерес, и основные варианты могут включать соединения с C-концевым лизином и гликозилированные соединения.

[9] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает удаление остатков, присоединенных путем N-гликозилирования Fc, из указанного белка, представляющего интерес, перед загрузкой указанного образца в указанную АЕХ-колонку. Этот этап может обеспечить улучшение АЕХ-разделения благодаря превращению аспарагиновых остатков в аспарагиновую кислоту. В конкретном аспекте этого варианта реализации изобретения остатки, присоединенные путем N-гликозилирования Fc, из указанного белка, представляющего интерес, удаляют с использованием PNGазы F. В другом конкретном аспекте этого варианта реализации изобретения способ может дополнительно включать обработку указанного образца в условиях, обеспечивающих расщепление.

[10] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр осуществляет анализ в нативных условиях.

[11] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает обработку указанного образца в условиях, обеспечивающих расщепление, перед загрузкой указанного образца в АЕХ-колонку. В одном конкретном аспекте условия, обеспечивающие расщепление, включают применение IdeS или его варианта.

[12] В одном типовом варианте реализации изобретения способ включает: (а) подвергание образца, содержащего белок, представляющий интерес, и по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант, условиям, обеспечивающим дегликозилирование;

(b) загрузку указанного образца в колонку для анионообменной хроматографии (АЕХ); (с) применение возрастающего градиента концентрации соли к загруженной анионообменной колонке для получения элюата; (d) сбор по меньшей мере одной фракции из (с); и (е) подвергание указанной по меньшей мере одной фракции масс-спектрометрическому анализу для определения характеристик указанного по меньшей мере одного отличающегося зарядом варианта указанного белка, представляющего интерес.

[13] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает применение возрастающего градиента концентрации соли к загруженной анионообменной колонке, причем градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 600 мМ соли аммония. В одном конкретном аспекте соль аммония представляет собой ацетат аммония. В другом конкретном аспекте градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 300 мМ соли аммония. В другом конкретном аспекте применяемый возрастающий градиент концентрации соли является линейным.

[14] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает отслеживание элюата из (с) в отношении поглощения ультрафиолета и сбор указанной по меньшей мере одной фракции, которая элюируется до элюирования белка, представляющего интерес. В другом аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает отслеживание элюата из (с) в отношении поглощения ультрафиолета и сбор указанной по меньшей мере одной фракции, которая элюируется после элюирования белка, представляющего интерес.

[15] В одном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, имеет значение pI более чем около 6,2. В конкретном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, имеет значение pI от около 6,2 до около 7,0. В конкретном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, имеет значение pI от около 6,2 до около 8,7.

[16] В одном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой моноклональное антитело на основе IgG4. В другом аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой моноклональное антитело на основе IgG1. В еще одном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой биспецифическое моноклональное антитело.

[17] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает снижение скорости потока из (d) посредством делителя потока до подвергания указанной по меньшей мере одной фракции масс-спектрометрии.

[18] В одном аспекте варианта реализации изобретения указанный по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант может представлять собой либо кислый вариант, либо основной вариант белка, представляющего интерес. Например, кислые варианты могут включать соединения, являющиеся продуктом дезамидирования,

гликирования, глюкуронирования, и/или высокомолекулярные соединения белка, представляющего интерес, и основные варианты могут включать соединения с С-концевым лизином и гликозилированные соединения.

[19] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает удаление остатков, присоединенных путем N-гликозилирования Fc, из указанного белка, представляющего интерес, перед загрузкой указанного образца в АЕХ-колонку. Этот этап может обеспечить улучшение АЕХ-разделения благодаря превращению аспарагиновых остатков в аспарагиновую кислоту. В конкретном аспекте этого варианта реализации изобретения остатки, присоединенные путем N-гликозилирования Fc, из указанного белка, представляющего интерес, удаляют с использованием PNGазы F.

[20] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр осуществляет анализ в нативных условиях.

[21] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает обработку указанного образца в условиях, обеспечивающих расщепление, перед загрузкой указанного образца в указанную АЕХ-колонку. В одном конкретном аспекте условия, обеспечивающие расщепление, включают применение IdeS или его варианта.

[22] В одном типовом варианте реализации изобретения способ включает: (a) подвергание образца, содержащего белок, представляющий интерес, и по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант, условиям, обеспечивающим расщепление, и условиям, обеспечивающим дегликозилирование; (b) загрузку указанного образца в колонку для анионообменной хроматографии (АЕХ); (c) применение возрастающего градиента концентрации соли к загруженной анионообменной колонке для получения элюата; (d) сбор по меньшей мере одной фракции из (c); и (e) подвергание указанной по меньшей мере одной фракции масс-спектрометрическому анализу для определения характеристик указанного по меньшей мере одного отличающегося зарядом варианта указанного белка, представляющего интерес.

[23] В одном аспекте варианта реализации изобретения условия, обеспечивающие расщепление, включают применение IdeS или его варианта.

[24] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает применение возрастающего градиента концентрации соли к загруженной анионообменной колонке, причем градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 600 мМ соли аммония. В одном конкретном аспекте соль аммония представляет собой ацетат аммония. В другом конкретном аспекте градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 300 мМ соли аммония. В другом конкретном аспекте применяемый возрастающий градиент концентрации соли является линейным.

[25] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает отслеживание элюата из (c) в отношении поглощения ультрафиолета и сбор

указанной по меньшей мере одной фракции, которая элюируется до элюирования белка, представляющего интерес. В другом аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает отслеживание элюата из (с) в отношении поглощения ультрафиолета и сбор указанной по меньшей мере одной фракции, которая элюируется после элюирования белка, представляющего интерес.

[26] В одном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, имеет значение pI более чем около 6,2. В конкретном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, имеет значение pI от около 6,2 до около 7,0. В конкретном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, имеет значение pI от около 6,2 до около 8,7.

[27] В одном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой моноклональное антитело на основе IgG4. В другом аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой моноклональное антитело на основе IgG1. В еще одном аспекте варианта реализации изобретения белок, представляющий интерес, представляет собой биспецифическое моноклональное антитело.

[28] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает снижение скорости потока из (d) посредством делителя потока до подвергания указанной по меньшей мере одной фракции масс-спектрометрии.

[29] В одном аспекте варианта реализации изобретения указанный по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант может представлять собой либо кислый вариант, либо основной вариант белка, представляющего интерес. Например, кислые варианты могут включать соединения, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования, глюкуронирования, и/или высокомолекулярные соединения белка, представляющего интерес, и основные варианты могут включать соединения с С-концевым лизином и гликозилированные соединения.

[30] В одном аспекте варианта реализации изобретения способ дополнительно включает удаление остатков, присоединенных путем N-гликозилирования Fc, из указанного белка, представляющего интерес, перед загрузкой указанного образца в указанную АЕХ-колонку. Этот этап может обеспечить улучшение АЕХ-разделения благодаря превращению аспарагиновых остатков в аспарагиновую кислоту. В конкретном аспекте этого варианта реализации изобретения остатки, присоединенные путем N-гликозилирования Fc, из указанного белка, представляющего интерес, удаляют с использованием PNGазы F.

[31] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр осуществляет анализ в нативных условиях.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[32] На Фиг. 1 проиллюстрированы концепции градиента pH и градиента концентрации соли в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[33] На Фиг. 2А показан диапазон pH буферов на основе солей, используемых для

градиентов рН, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[34] На Фиг. 2В показан диапазон рI антител в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[35] На Фиг. 2С показаны значения рI антител, тестируемых с помощью АЕХ-MS-способа по данному изобретению в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[36] На Фиг. 3 проиллюстрирована устойчивая к высокому содержанию солей система для нативной АЕХ-MS в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[37] На Фиг. 4А показана запись градиента рН в АЕХ-MS в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[38] На Фиг. 4В показана запись градиента концентрации соли в АЕХ-MS в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[39] На Фиг. 5А показан нативный АЕХ-MS-анализ антител с различными рI в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[40] На Фиг. 5В показан нативный АЕХ-MS-анализ антител с различными рI в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[41] На Фиг. 5С показан нативный АЕХ-MS-анализ антител с различными рI в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[42] На Фиг. 5D показаны рI и эффективность АЕХ-разделения для каждого из антител из Фиг. 5А-С.

[43] На Фиг. 6А показаны АЕХ-ТIC антител различного типа и рI в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[44] На Фиг. 6В показано увеличенное изображение АЕХ-ТIC из Фиг. 6А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[45] На Фиг. 7 показана АЕХ-ТIC дегликозилированного расщепленного FabRICATOR IgG4-mAb в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[46] На Фиг. 8А показана SCX-ТIC антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[47] На Фиг. 8В показана АЕХ-ТIC антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[48] На Фиг. 9 проиллюстрировано дегликозилирование антитела с использованием PNGазы F в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[49] На Фиг. 10А показаны результаты сравнения АЕХ-ТIC недегликозилированного и дегликозилированного антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[50] На Фиг. 10В показаны результаты сравнения АЕХ-ТIC недегликозилированного и дегликозилированного антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[51] На Фиг. 10С показаны результаты сравнения АЕХ-ТІС недегликозилированного и дегликозилированного антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[52] На Фиг. 11А показаны результаты сравнения АЕХ-ТІС недегликозилированного и дегликозилированного антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[53] На Фиг. 11В показано увеличенное изображение АЕХ-ТІС из Фиг. 11А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[54] На Фиг. 12 показаны результаты сравнения АЕХ-ТІС недегликозилированного и дегликозилированного антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[55] На Фиг. 13 показаны результаты сравнения АЕХ-ТІС недегликозилированного и дегликозилированного антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[56] На Фиг. 14А показаны результаты сравнения АЕХ-ТІС недегликозилированного контроля способа для антитела и недегликозилированной близкой к кислой фракции антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[57] На Фиг. 14В показано увеличенное изображение АЕХ-ТІС из Фиг. 14А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[58] На Фиг. 14С показаны результаты сравнения АЕХ-ТІС дегликозилированного контроля способа для антитела и дегликозилированной близкой к кислой фракции антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[59] На Фиг. 14D показано увеличенное изображение АЕХ-ТІС из Фиг. 14С в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[60] На Фиг. 15А показаны результаты сравнения АЕХ-ТІС недегликозилированного антитела из лекарственной субстанции и недегликозилированной общей кислой фракции антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[61] На Фиг. 15В показаны результаты сравнения АЕХ-ТІС дегликозилированного антитела из лекарственной субстанции и дегликозилированной общей кислой фракции антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[62] На Фиг. 16 проиллюстрированы отличающиеся зарядом Fc-варианты, легко разделяемые с помощью АЕХ-MS, включая варианты, являющиеся продуктом гликозилирования, дезамидирования, и варианты с С-концевыми лизиновыми остатками, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[63] На Фиг. 17А показаны АЕХ-ТІС дегликозилированных Fc-областей различных антител в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[64] На Фиг. 17В показано увеличенное изображение АЕХ-ТІС из Фиг. 17А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[65] На Фиг. 18А показана АЕХ-ТІС контроля и подвергнутого стрессу дегликозилированного образца Fc в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[66] На Фиг. 18В показано количественное определение отличающихся зарядом вариантов из Фиг. 18А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[67] На Фиг. 19 проиллюстрирован обмен Fc биспецифического антитела в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[68] На Фиг. 20 показана АЕХ-ТІС недегликозилированного расщепленного FabRICATOR bsAb в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[69] Детальное определение характеристик биотерапевтических белков является крайне важным требованием на всех этапах разработки и контроля качества конечного продукта. Каждый белок будет иметь несколько разных вариантных форм вследствие множества посттрансляционных модификаций, которые могут изменять распределение заряда на поверхности белка. Это может быть обусловлено модификацией, которая напрямую изменяет состояние заряда, или путем опосредованного изменения доступности поверхностного заряда посредством конформационного изменения. Такие модификации могут быть разделены хроматографически с использованием ионообменного (ІЕХ) анализа.

[70] Ранее были разработаны способы использования ионообменной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией в режиме реального времени для определения характеристик отличающихся зарядом вариантов среди интактных белков. Однако опубликованные к настоящему времени способы иллюстрируют определение характеристик белков в отношении их отличающихся зарядом вариантов, когда белок имеет pI менее 6,0. Например, Leblanc *et al.* охарактеризовали отличающиеся зарядом варианты сывороточного альбумина человека (HSA) (pI=4,7) с использованием анионообменной хроматографии (АЕХ) в сочетании с MS в режиме реального времени. См. Leblanc *et al. J. Chroma. B*, 2018, 1095: 87-93.

[71] Fussl *et al.* также описали АЕХ-способ на основе применения градиента pH, который был напрямую связан с масс-спектрометрией, для определения характеристик отличающихся зарядом вариантов на уровне интактного белка в нативных условиях. Fussl *et al. J. Proteome Res.*, 2019, 18: 3689-3702. Однако элюирование градиентом pH по разработанному способу способствовало хроматографической селективности и общей применимости только для анионных белков со значениями pI <6,5, таких как трансферрин (pI=5,2-5,6), овальбумин (pI=4,5) и асиало- α -1-AGP (pI=2,8-3,8). *Id.* на 3690.

[72] Совсем недавно Van Schaik *et al.* применили АЕХ-MS для отслеживания нескольких показателей качества биофармацевтического эритропоэтина (ЕРО, pI=4,4-5,1). Во всех вышеупомянутых способах для разделения белков и их отличающихся зарядом вариантов используется элюирование pH-градиентом.

[73] В данном изобретении описан АЕХ-способ, подходящий для определения характеристик отличающихся зарядом вариантов белков, которые могут иметь значения pI от около 6,0 до около 7,0. Два основных механизма элюирования белков из АЕХ-колонки были проанализированы для изучения разделения отличающихся зарядом вариантов из белков с более высоким значением pI , чем было опубликовано ранее. См., например, Фиг. 1. При элюировании градиентом концентрации соли, белки продвигаются вниз по колонке от ионообменного участка к ионообменному участку, конкурируя с ионами соли в градиенте концентрации соли. Эффект фокусировки возникает при повышении концентрации соли. При элюировании градиентом pH белки будут элюировать из колонки при достижении точки pH , при которой они практически не имеют заряда. Дальнейшее снижение pH в ходе градиента будет делать белок более катионным и, следовательно, вытеснит его из содержащейся в колонке смолы. Это является важным отличием от градиентов концентрации соли, поскольку тогда они будут очень мало взаимодействовать с остальной частью колонки.

[74] Преимущества градиентов pH также наблюдаются при увеличении емкости загрузки образца, поскольку белки хорошо перефокусируются при определенном pH элюирования, независимо от положения, в котором они первоначально были связаны на колонке. Это также компенсирует эффект высокого содержания соли в образце, тем самым уменьшая эффекты матрицы образца. Этот обычно используемый и предпочтительный способ элюирования, в котором применяется элюирование градиентом pH , не был пригоден в случае белков, имеющих pI более чем около 7, поскольку трудно достичь требуемого pH с использованием буферов, которые могут быть совместимы с приборами MS (т. е. трудно достичь градиентов pH в требуемом диапазоне pH выше 7,0 с использованием MS-совместимых солей, которые имеют буферный промежуток вблизи диапазона pI антител). Например, белки, имеющие более высокое pI , по сравнению с ранее опубликованными, попадут в буферный промежуток, в котором невозможно будет использовать MS-совместимые соли. См., например, Фиг. 2А. Теоретически этот промежуток затрудняет разделение антител с помощью АЕХ из-за их относительно высокого pI , как показано на Фиг. 2В. Тестируемые IgG1-антитела характеризовались тенденцией иметь более высокий pI по сравнению с IgG4-антителами, как показано на Фиг. 2В и 2С.

[75] В данном изобретении изложен новый нативный АЕХ-MS-способ определения характеристик отличающихся зарядом вариантов белков с помощью АЕХ-MS с использованием градиента концентрации соли.

[76] Если не указано иное, все применяемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в области, 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, далее будут описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в данный документ посредством

ссылки.

[77] Следует понимать, что слова в единственном числе означают «по меньшей мере один», а термины «около» и «примерно» следует понимать как допускающие стандартные отклонения, как будет понятно специалистам в данной области техники; и в случаях, когда приведены диапазоны, включены конечные точки.

[78] В контексте данного документа термин «белок» включает любой полимер из аминокислот, имеющий ковалентные амидные связи. Белки содержат одну или несколько полимерных цепей из аминокислот, в целом известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов, связанных пептидными связями, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов. Термин «синтетические пептиды или полипептиды» относится к не встречающимся в природе пептидам или полипептидам. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Известны различные способы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или множество полипептидов, образующих единую функционирующую биомолекулу. Белок может включать любые биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие химерные слитые белки рецептор-Fc, белки, антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, человеческие антитела и биспецифические антитела. В другом иллюстративном аспекте белок может включать фрагменты антител, наноантитела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием рекомбинантных клеточных систем продуцирования, таких как бакуловирусная 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. Такие модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), PEG, полигистидин, FLAG-метку, мальтозосвязывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), мус-эпитоп, флуоресцентные метки и другие красители и т. п. Белки можно классифицировать на основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать 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.

[79] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения белок, представляющий интерес, может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело или Fc-слитый белок.

[80] В контексте данного документа термин «антитело» включает 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 (в данном документе сокращено как 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 (в данном документе сокращено как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). V_H - и V_L -области дополнительно могут быть разделены на гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных, от amino-конца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В разных типовых вариантах реализации изобретения FR антитела к большому ET-1 (или его антигенсвязывающая часть) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определять на основе сравнительного анализа двух или более CDR. Термин «антитело» в контексте данного документа также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полных антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. д. в контексте данного документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методов геной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полных антител с применением любых подходящих стандартных методик, таких как методики на основе протеолитического расщепления или методы генетической инженерии рекомбинантных ДНК, предусматривающие осуществление манипуляций и экспрессии ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антител. Такая ДНК известна и/или является легкодоступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно подвергать секвенированию и химическим манипуляциям с использованием методов молекулярной биологии, например, чтобы разместить один или несколько

вариабельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для включения кодонов, внесения цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

[81] В контексте данного документа термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или вариабельная область антитела. Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fc-фрагмент, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело dsFv, dAb-фрагмент, Fd'-фрагмент, Fd-фрагмент и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Fv-фрагменты представляют собой комбинацию вариабельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых вариабельные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены с помощью пептидного линкера. 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. Альтернативно, или дополнительно, фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно, или дополнительно, фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, с помощью дисульфидных связей. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс.

[82] В контексте данного 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 данного изобретения, могут быть получены с использованием широкого спектра методик, известных в данной области техники, в том числе с использованием гибридомной технологии, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинаций.

[83] В контексте данного документа термин «Fc-слитые белки» включает часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые в природном состоянии не являются слитыми. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями происходящих из антитела полипептидов (включая Fc-домен), описано, например, 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",

в *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, сс. 10.19.1-10.19.11, 1992. «Рецепторные Fc-слитые белки» содержат один или несколько внеклеточных доменов рецептора в сочетании с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах реализации изобретения содержит шарнирную область, за которой следуют СН2- и СН3-домен иммуноглобулина. В некоторых вариантах реализации изобретения Fc-слитый белок содержит две или более отдельных цепей рецептора, которые связываются с одним или более чем одним лигандом. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок-ловушку, такой как, например, белок-ловушка для IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лигандсвязывающую область RACP IL-1, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитой с Fc hIgG1; см. заявку на выдачу патента США № 6,927,004, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки), или белок-ловушка для VEGF (например, афлиберцепт, который содержит Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, слитым с Fc hIgG1; например, SEQ ID NO:1; см. заявки на выдачу патента США №№ 7,087,411 и 7,279,159, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки)

[84] В контексте данного документа общий термин «посттрансляционные модификации» или «PTM» относятся к ковалентным модификациям, которым полипептиды подвергаются либо в ходе (котрансляционная модификация), либо после (посттрансляционная модификация) их синтеза на рибосомах. PTM обычно вводятся посредством специфических ферментов или ферментных путей. Многие из них возникают в сайте специфической характерной белковой последовательности (сигнатурной последовательности) в пределах белкового остова. Было зарегистрировано несколько сотен PTM, и эти модификации неизменно влияют на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. "Proteins" (2014), второе издание, опубликовано Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансляционные модификации включают без ограничения расщепление, N-концевые удлинения, разрушение белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование лизиновых остатков с использованием биотина), амидирование C-конца, гликозилирование, иодирование, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование (добавление ацетильной группы, обычно на N-конце белка), алкилирование (добавление алкильной группы (например, метильной, этильной, пропильной), обычно по лизиновым или аргининовым остаткам), метилирование, аденилирование, АДФ-рибозилирование, ковалентные сшивки в пределах или между полипептидными цепями, сульфирование, пренилирование, витамин С-зависимые модификации (гидроксилирование пролина и лизина и карбокси-концевое амидирование), витамин К-зависимую модификацию, причем витамин К является кофактором при карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты, что приводит к образованию γ -карбоксиглутамата (glu-остаток), глутамилирование (ковалентное связывание остатков глутаминовой кислоты), глицилирование (ковалентное связывание глициновых остатков), гликозилирование (добавление гликозильной группы к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, что приводит к образованию гликопротеина),

изопренилирование (добавление изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липоилирование (присоединение липоатной функциональной группы), фосфопантетеинилирование (добавление 4'-фосфопантетеинильного фрагмента из кофермента А, как при биосинтезе жирных кислот, поликетидов, нерибосомных пептидов и лейцина), фосфорилирование (добавление фосфатной группы, обычно к серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфатирование (добавление сульфатной группы, обычно к тирозиновому остатку). Посттрансляционные модификации, которые изменяют химическую природу аминокислот, включают без ограничения цитруллинирование (превращение аргинина в цитруллин путем дезиминирования) и дезамидирование (превращение глутамина в глутаминовую кислоту или аспарагина в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, которые предусматривают структурные изменения, включают без ограничения образование дисульфидных мостиков (ковалентная связь двух цистеиновых аминокислот) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). Определенные посттрансляционные модификации предусматривают добавление других белков или пептидов, как, например, ISG-илирование (ковалентное связывание с белком ISG15 (ген, стимулируемый интерфероном, Interferon-Stimulated Gene)), сумоилирование (ковалентное связывание с белком SUMO (малый убиквитин-подобный белок-модификатор, Small Ubiquitin-related MOdifier)) и убиквитинирование (ковалентное связывание с белком убиквитином). См. Информационный ресурс по белкам Европейского института биоинформатики, Швейцарского института биоинформатики SIB, Европейский институт биоинформатики: DRS - предшественник дрозомицина - *Drosophila melanogaster* (дрозофила фруктовая) - ген и белок DRS, <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> (последнее посещение 15 января 2019 г.) в отношении более подробного нормативного словаря PTM, курируемого UniProt.

[85] В контексте данного документа термин «отличающиеся зарядом варианты» относится к полному набору вариантов продукта, включая без ограничения кислые соединения и основные соединения (например, Lys-варианты). В определенных вариантах реализации изобретения такие варианты могут включать агрегаты продукта и/или фрагменты продукта в той степени, в которой такая агрегация и/или фрагментация приводит к изменению заряда продукта.

[86] В контексте данного документа термин «кислые соединения» относится к вариантам белка, которые характеризуются общим отрицательным зарядом. Иллюстративные кислые соединения могут включать без ограничения варианты, являющиеся продуктом дезамидирования, варианты, являющиеся продуктом афукозилирования, варианты, являющиеся продуктом окисления, метилглиоксальные (MGO) варианты, варианты, являющиеся продуктом гликирования, и лимоннокислые варианты. Иллюстративные структурные варианты включают без ограничения варианты, являющиеся продуктом гликозилирования, и варианты, являющиеся продуктом ацетонирования. Иллюстративные варианты, являющиеся продуктом фрагментации, включают любые модифицированные белковые соединения из целевой молекулы,

образующиеся вследствие диссоциации пептидной цепи, ферментативные и/или химические модификации, включая без ограничения Fc- и Fab-фрагменты, фрагменты без Fab, фрагменты без варибельного домена тяжелой цепи, варианты с C-концевым усечением, варианты с вырезанием N-концевого Asp в легкой цепи и варианты с N-концевым усечением легкой цепи. Другие варианты, представляющие собой кислые соединения, включают варианты, содержащие неспаренные дисульфиды, белки клетки-хозяина и нуклеиновые кислоты хозяина, хроматографические материалы и компоненты среды. Часто кислые соединения элюируются после главного пика в ходе СЕХ или после главного пика в ходе АЕХ-анализа.

[87] В контексте данного документа термин «основные соединения» относится к вариантам белка, например, антитела или его антигенсвязывающей части, которые характеризуются общим положительным зарядом, по сравнению с исходными отличающимися зарядом вариантами соединений, присутствующими в белке. Иллюстративные основные соединения могут включать без ограничения варианты, являющиеся продуктом присоединения лизина, изомеризации аспарагиновой кислоты, образования сукцинимида по аспарагину, окисления метионина, амидирования, неполного образования дисульфидной связи, мутации с превращением серина в аргинин, агликозилирования, фрагментации и агрегации. Часто основные соединения элюируются после главного пика в ходе СЕХ или перед главным пиком в ходе АЕХ-анализа.

[88] В контексте данного документа «ионообменная хроматография» может относиться к вариантам разделения, включая любой способ, с помощью которого два вещества разделяются исходя из различий в их соответствующих ионных зарядах либо на молекуле, представляющей интерес, и/или хроматографическом материале в целом, либо локально на определенных областях молекулы, представляющей интерес, и/или хроматографического материала, и, таким образом, можно использовать либо катионообменный материал, либо анионообменный материал. С помощью ионообменной хроматографии разделяют молекулы исходя из различий между локальными зарядами молекул, представляющих интерес, и локальными зарядами хроматографического материала. Набивная колонка для ионообменной хроматографии или устройство с ионообменной мембраной могут работать в режиме связывания-элюирования, проточном режиме или гибридном режиме. После промывки колонки или мембранного устройства буфером для уравнивания или другим буфером, извлечения продукта можно достичь путем повышения ионной силы (т. е. электропроводности) буфера для элюирования для обеспечения конкуренции растворенного вещества за заряженные сайты ионообменной матрицы. Изменение рН и, тем самым, изменение заряда растворенного вещества, может представлять собой другой способ достижения элюирования растворенного вещества. Изменение электропроводности или рН может быть постепенным (градиентное элюирование) или поэтапным (ступенчатое элюирование). К матрицам могут быть присоединены анионные или катионные заместители для образования анионных или катионных носителей для хроматографии. Неограничивающие примеры анионообменных

заместителей включают группы, представляющие собой диэтиламиноэтил (DEAE), четвертичный аминоэтил (QAE) и четвертичные аммониевые соединения (Q).

[89] В контексте данного документа термин «масс-спектрометр» включает устройство, выполненное с возможностью идентификации конкретных соединений и измерения их точных масс. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в который может быть элюирован полипептид или пептид для детекции и/или определения характеристик. Масс-спектрометр может включать три основных части: источник ионов, масс-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). Выбор источника ионов во многом зависит от области применения.

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

[91] В контексте данного документа термин «ионизация электрораспылением» или «ESI» относится к способу распылительной ионизации, при котором катионы или анионы в растворе переносятся в газовую фазу путем образования и десольватации при атмосферном давлении пара из сильно заряженных капелек, получаемого при приложении разности потенциалов между наконечником распыляющего капилляра, содержащего раствор, и противоэлектродом.

[92] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может быть масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением.

[93] Термин «наноэлектрораспыление» или «наноэлектроспрей» в контексте данного документа относится к ионизации электрораспылением при очень низкой скорости потока растворителя, как правило, сотни нанолитров в минуту раствора образца или ниже, часто без применения внешней подачи растворителя. В установке для впрыска электрораспылением, обеспечивающей наноэлектрораспыление, может применяться статичный источник наноэлектрораспыления или динамичный источник наноэлектрораспыления. Статичный источник наноэлектрораспыления осуществляет непрерывный анализ небольших объемов раствора образца (аналита) на протяжении длительного периода времени. В динамичном источнике наноэлектрораспыления используется капиллярная колонка и система доставки растворителя для осуществления хроматографических разделений смесей до проведения анализа масс-спектрометром.

[94] В контексте данного документа термин «масс-анализатор» включает 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), магнитоэлектрический сектор, квадрупольный масс-фильтр (Q), квадрупольную ионную ловушку (QIT), орбитальную ионную ловушку, масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (FTICR), а также методику масс-спектрометрии с

ускорителем (AMS).

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

[96] В контексте данного документа термин «нативные условия», или «нативная MS», или «нативная ESI-MS» может включать осуществление масс-спектрометрии в условиях, которые обеспечивают сохранение нековалентных взаимодействий в анализе. Подробный обзор нативной MS см. в обзоре: Elisabetta Boeri Erba & Carlo Petosa, *The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes*, 24 Protein Science 1176-1192 (2015). Некоторые различия между нативной ESI и обычной ESI 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)).

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

[98] В контексте данного документа термин «тандемная масс-спектрометрия» включает методику, в которой структурную информацию о молекулах образца получают посредством применения множества этапов отбора по массе и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в интактном виде, и что может быть индуцирован их распад в некоторой степени предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массе. Многоступенчатая MS/MS, или MS^n , может быть выполнена путем сначала отбора 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 MS успешно выполняли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализатора для конкретного применения определяется множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Две основные категории способов тандемной MS представляют собой «тандем в пространстве» и «тандем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «тандем во времени» соединены 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 масс-анализатора без захвата. 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.

[99] Идентифицированные масс-спектрометром пептиды могут использоваться в

качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно использовать для определения характеристик белков посредством сопоставления экспериментальных и теоретических данных MS/MS, при этом последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Указанное определение характеристик может включать без ограничения секвенирование аминокислот белковых фрагментов, проведение секвенирования белка, проведение секвенирования белка *de novo*, локализацию посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

[100] В контексте данного документа термин «база данных» относится к биоинформатическим инструментам, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров MS-MS по всем возможным последовательностям в базе(базах) данных. Неограничивающие примеры таких инструментов представляют собой Mascot (<http://www.matrixscience.com>), Spectrum Mill (<http://www.chem.agilent.com>), PLGS (<http://www.waters.com>), PEAKS (<http://www.bioinformaticssolutions.com>), Proteinpilot (<http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot>), Phenyx (<http://www.phenyx-ms.com>), Sorcerer (<http://www.sagenresearch.com>), OMSSA (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/>), X!Tandem (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>), Protein Prospector (<http://www.prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>) или Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

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

[102] В контексте данного документа термин «гидролизующее средство» относится к любому из большого числа разных средств, которые могут осуществлять расщепление белка, или их комбинации. Неограничивающие примеры гидролизующих средств, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают трипсин, эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C, протеазу T наружной мембраны (OmpT), иммуноглобулин-разрушающий фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназу и протеазу из *Aspergillus Saitoi*. Неограничивающие примеры гидролизующих средств, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают применение высокой температуры, микроволнового излучения, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения, растворителей (неограничивающими примерами являются этанол и ацетонитрил), расщепления иммобилизованных ферментов (IMER), ферментов, иммобилизованных на магнитных частицах, и ферментов, иммобилизованных на чипе.

Недавний обзор, в котором обсуждаются доступные методики 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). Одно гидролизующее средство или их комбинация могут расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде специфическим в отношении последовательности способом, в результате чего образуется предсказуемый набор более коротких пептидов.

ПРИМЕРЫ

[103] Образцы терапевтических mAb на основе IgG1 и IgG4 либо анализировали напрямую, либо обрабатывали PNGазой F и/или FabRICATOR перед введением и разделением на колонке YMC BioPro QA-F SAX (4,6×100 мм). Описанную ранее платформу для нативной LC-MS применяли для обеспечения аналитической скорости потока (0,4 мл/мин) с ионизацией нанозлектрораспылением (NSI). Подвижные фазы на основе ацетата аммония, находящиеся в диапазоне концентраций от 10 до 300 мМ, использовали для разработки градиента на основе соли для элюирования mAb. Для изучения пиков вариантов, образующихся в результате реакций либо сайт-специфического дезамидирования, либо дегликозилирования, проводили анализы с использованием оффлайн-фракционирования и картирования пептидов, образующихся в результате расщепления трипсином. Также использовали синтетические пептиды для дифференциации продуктов дезамидирования (например, изо-Asp в сравнении с Asp) на основе выравнивания времени удерживания.

[104] Для разработки способа по данному изобретению сперва изучали АЕХ с использованием режимов либо градиента рН, либо концентрации соли, как проиллюстрировано на Фиг. 1. Используемая система представляла собой Dionex Ultimate 3000 HPLC - Q Exactive UHMR. Иллюстративные система и способ АЕХ-MS описаны в Yan *et al.*, 2020, *J Am Soc Mass Spectrom*, 31:2171-2179, которая включена в данный документ посредством ссылки, и они проиллюстрированы на Фиг. 3.

[105] Эксперименты, в которых использовали АЕХ-MS с градиентом рН или градиентом концентрации соли, показаны на Фиг. 4А и 4В. С помощью линейного градиента рН с требуемым диапазоном уровней рН невозможно достичь АЕХ-анализа mAb с использованием MS-совместимых подвижных фаз на основе аммония. Однако его можно достичь с помощью линейного градиента концентрации соли с использованием MS-совместимых подвижных фаз. Разработанная платформа для нативной LC-MS может выдерживать концентрации соли вплоть до 600 мМ.

[106] Широкий спектр антител был протестирован с использованием системы АЕХ-MS для определения того, какие mAb больше всего подходят для АЕХ-разделения. АЕХ ТИС тестируемых антител показаны в порядке возрастания рI на Фиг. 5А, 5В и 5С, при этом обобщенные результаты показаны на 5D. В целом mAb с относительно низкими рI (рН < 7) разделялись с помощью АЕХ лучше.

[107] Другое сравнение mAb и bsAb выполняли с использованием АЕХ-MS-способа по данному изобретению. АЕХ-ТИС в полном масштабе показаны на Фиг. 6А и

АЕХ-ТІС с 3х увеличением показаны на Фиг. 6В. Показано, что нативный АЕХ-MS-способ является подходящим для большинства молекул IgG4 со средним pI, что обеспечивает возможность идентификации различных кислых и основных соединений, и является менее пригодным для IgG1-mAb с высоким pI. В целом АЕХ-разделение улучшалось для молекул с более низким pI. Наблюдаемые распространенные кислые варианты включали таковые, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования, и NeuAc. Наблюдаемые распространенные основные варианты включали частично и негликозилированные соединения и соединения с С-концевыми лизиновыми остатками.

[108] Дополнительный анализ проводили в отношении дегликозилированных IgG4-mAb, которые обрабатывали IdeS (FabRICATOR® от Genovis) для проведения отслеживания Fc-признака, как показано на Фиг. 7. Было обнаружено, что специфические кислые пики коррелируют с сайт-специфическим дезамидированием. Идентифицированные вещества подтверждали путем фракционирования дегликозилированного и расщепленного FabRICATOR® подвергнутого термическому стрессу образца IgG4 путем осуществления последующего картирования восстановленных пептидов и сравнения результатов с синтетическими пептидами.

[109] Сравнение выполняли между SCX-MS и АЕХ-MS для Ab21, как показано на Фиг. 8А, в сравнении с 8В. С помощью АЕХ-MS можно было идентифицировать большее число вариантов, по сравнению с SCX-MS, что демонстрирует, что в случае белков с более низкими pI АЕХ может быть пригодной альтернативой SCX.

[110] В способ по данному изобретению были внесены дополнительные усовершенствования. АЕХ-разделение улучшали путем дегликозилирования анализируемого антитела PNGазой F, снижая pI образца, как проиллюстрировано на Фиг. 9. Недегликозилированные и дегликозилированные антитела подвергали АЕХ-MS-анализу и сравнивали АЕХ-ТІС. Дегликозилирование снижало pI mAb, что приводило к более позднему элюированию и улучшению разделения и разрешения АЕХ, как показано на Фиг. 10А-С. В случае mAb с относительно высокими pI (pH > 7), этап дегликозилирования может содействовать удержанию молекулы, однако улучшение разрешения было не таким значительным, как в случае mAb с более низкими pI.

[111] Дополнительное сравнение недегликозилированного и дегликозилированного mAb, подвергнутого АЕХ-MS, показано на Фиг. 11А, с увеличением на Фиг. 11В. С помощью указанного способа можно было выявить большое число основных и кислых соединений и дифференцировать разные модификации белка. После дегликозилирования общее разрешение улучшалось. Выявленные основные варианты включали варианты с С-концевыми лизиновыми остатками и подвергнутые превращению частично гликозилированные соединения. Выявленные кислые варианты включали соединения, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования/глиукуронирования, и высокомолекулярные (НМW) соединения.

[112] Аналогичное сравнение осуществляли для другого антитела, как показано на Фиг. 12. И снова, разрешение АЕХ значительно улучшалось после дегликозилирования.

Выявленные основные варианты включали варианты с С-концевыми лизиновыми остатками, негликозилированные соединения и подвергнутые превращению частично гликозилированные соединения. Выявленные кислые варианты включали соединения, являющиеся продуктом дезамидирования и гликирования/глюкуронирования.

[113] АЕХ-MS-анализ с дегликозилированием или без него осуществляли для другого антитела, как показано на Фиг. 13. И снова, разрешение АЕХ значительно улучшалось после дегликозилирования. Выявленные основные варианты включали варианты с С-концевым лизиновым остатком и подвергнутые превращению частично гликозилированные соединения. Выявленные кислые варианты включали соединения, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования/глюкуронирования, и NeuAc.

[114] Существует множество потенциальных применений способа по данному изобретению. Например, АЕХ-MS использовали для подробного определения характеристик подвергнутых обогащению отличающихся зарядом вариантов, как показано на Фиг. 14. Контрольные образцы (контроль способа) сравнивали с фракционированными соединениями, близкими к кислым (кислые 1), в недегликозилированных и гликозилированных образцах, и подвергали АЕХ-MS-анализу. Наблюдаемые основные варианты в контроле способа включают варианты с сукцинимидом и С-концевым лизином, как показано на Фиг. 14А и 14В. Наблюдаемые кислые варианты включают варианты, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования/глюкуронирования, и варианты с сиаловой кислотой (NeuAc). С помощью указанного способа можно было дополнительно разделять отличающиеся зарядом варианты в сайт-специфических сайтах дезамидирования. После дегликозилирования также идентифицировали дополнительные сукцинимидные пики, как показано на Фиг. 14С и 14D.

[115] Анализ отличного подвергнутого обогащению отличающегося зарядом варианта осуществляли для другого антитела, как показано на Фиг. 15. Антитело в качестве лекарственного вещества сравнивали с общей фракцией кислых соединений. Общий пул кислых соединений состоит из кислых вариантов, таких как варианты, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования/глюкуронирования, и варианты с сиаловой кислотой (NeuAc), как показано на Фиг. 15А. Кислые варианты можно было дополнительно разделять в специфических сайтах дезамидирования. После дегликозилирования наблюдалось дополнительное разделение НМW-соединений, как показано на Фиг. 15В.

[116] Вторым исследованным применением было использование АЕХ-MS для отслеживания Fc-признака с высоким разрешением. После дегликозилирования, с помощью АЕХ-MS можно одновременно отслеживать состояние гликозилирования, С-концевые лизиновые остатки и сайт-специфическое дезамидирование, как проиллюстрировано на Фиг. 16. Поскольку Fc-область родственных антител, например, IgG4, совпадает, анализ Fc-признаков обеспечивает репрезентативную информацию для широкого спектра антител. Иллюстративный анализ спектра белков показан на Фиг. 17А и

17В, с разными пиками, соответствующими вариантам, являющимся продуктом гликозилирования, вариантам с С-концевыми лизиновыми остатками и вариантам, являющимся продуктом сайт-специфического дезамидирования. Было продемонстрировано, что указанный способ широко применим к IgG4-антителам.

[117] Этот анализ дополнительно применяли для отслеживания стабильности образцов, как показано на Фиг. 18. АЕХ-ТIC, на которой показано разделение модифицированных антител, показана на Фиг. 18А, с двумя перекрывающимися записями, указывающими на необработанный образец (черным, нижняя запись) и подвергнутый стрессу образец (красным, верхняя запись). Подвергнутый стрессу образец хранили при 25 °С в течение 6 месяцев до проведения анализа. Распространенность разных отличающихся зарядом соединений можно сравнивать и количественно определять, как показано на Фиг. 18В. В этом примере, применение АЕХ-MS-способа по данному изобретению позволило обнаружить, что количество кислых вариантов антитела (см., например, А1) увеличивалось после термического стресса. Судя по предыдущим исследованиям, специфический сайт дезамидирования А1, вероятно, коррелирует с VSNK.

[118] Еще одним изучаемым применением является использование АЕХ-MS для отслеживания обмена Fc и Fc* в биспецифическом антителе. Известно, что IgG4 может подвергаться быстрой замене Fc после удаления шарнирных дисульфидных связей. В случае bsAb, обмен Fc и Fc* будет происходить в соотношении 1:2:1 продуктов Fc*/Fc* : Fc*/Fc : Fc/Fc после расщепления FabRICATOR[®], как проиллюстрировано на Фиг. 19. АЕХ-MS-способ по данному изобретению применяли для продуктов расщепления bsAb FaBRICATOR[®], и он оказался достаточно чувствительным для выявления Fc-обмена и разделения Fc-соединений в предсказуемом соотношении 1:2:1, как показано на Фиг. 20. В этом примере Fc* имел гораздо более высокое содержание С-концевого лизина по сравнению с Fc.

[119] Был разработан способ нативной АЕХ-MS на основе градиента концентрации соли, который потенциально может быть применен к ряду анализов белков, включая анализ отличающихся зарядом вариантов mAb с относительно низкими pI. Профиль АЕХ-разделения и разрешение mAb можно дополнительно улучшить путем дегликозилирования. АЕХ очень чувствителен к состояниям гликозилирования, а также к С-концевому лизину и дезамидированию. Распространенные основные варианты, наблюдаемые в АЕХ-MS, включают варианты с С-концевым лизином, негликозилированные или частично гликозилированные варианты, и сукцинимид. Распространенные кислые варианты, наблюдаемые в АЕХ-MS, включают NeuAc, варианты, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования и глюкуронырования.

[120] АЕХ можно использовать ортогонально для углубленного определения характеристик образцов подвергнутых обогащению отличающихся зарядом вариантов на этапе ВLA. АЕХ-MS также можно использовать для отслеживания Fc-признака с высоким разрешением и, в частности, для отслеживания сайт-специфического дезамидирования.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения характеристик по меньшей мере одного отличающегося зарядом варианта белка, представляющего интерес, включающий:

а) загрузку образца, содержащего белок, представляющий интерес, и по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант указанного белка, представляющего интерес, в колонку для анионообменной хроматографии (АЕХ);

б) применение возрастающего градиента концентрации соли к загруженной анионообменной колонке для получения элюата;

с) сбор по меньшей мере одной фракции из б); и

д) подвергание указанной по меньшей мере одной фракции масс-спектрометрическому анализу для определения характеристик указанного по меньшей мере одного отличающегося зарядом варианта указанного белка, представляющего интерес.

2. Способ по п. 1, где градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 600 мМ соли аммония.

3. Способ по п. 1, где градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 300 мМ соли аммония.

4. Способ по п. 1, где применяемый возрастающий градиент концентрации соли является линейным.

5. Способ по п. 3, где применяемый возрастающий градиент концентрации соли является линейным.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий отслеживание элюата из б) в отношении поглощения ультрафиолета и сбор указанной по меньшей мере одной фракции, которая элюируется до или после элюирования белка, представляющего интерес.

7. Способ по п. 1, где белок, представляющий интерес, имеет значение pI более чем около 6,2.

8. Способ по п. 1, где белок, представляющий интерес, представляет собой моноклональное антитело на основе IgG4.

9. Способ по п. 1, где белок, представляющий интерес, представляет собой биспецифическое моноклональное антитело.

10. Способ по п. 1, где по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант представляет собой соединения, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования, глюкуронирования, высокомолекулярные соединения, соединения с С-концевым лизином или гликозилированные соединения белка, представляющего интерес.

11. Способ по п. 1 дополнительно включающий удаление остатков, присоединенных путем N-гликозилирования Fc, из указанного белка, представляющего интерес, перед загрузкой указанного образца в АЕХ-колонку.

12. Способ по п. 1, дополнительно включающий обработку указанного образца в условиях, обеспечивающих расщепление, перед загрузкой указанного образца в АЕХ-

колонку.

13. Способ по п. 12, где условия, обеспечивающие расщепление, включают применение IdeS или его варианта.

14. Способ по п. 1, где масс-спектрометр осуществляет анализ в нативных условиях.

15. Способ определения характеристик по меньшей мере одного отличающегося зарядом варианта белка, представляющего интерес, включающий:

а) подвергание образца, содержащего белок, представляющий интерес, и по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант, условиям, обеспечивающим дегликозилирование;

б) загрузку указанного образца в колонку для анионообменной хроматографии (АЕХ);

с) применение возрастающего градиента концентрации соли к загруженной анионообменной колонке для получения элюата;

д) сбор по меньшей мере одной фракции из с); и

е) подвергание указанной по меньшей мере одной фракции масс-спектрометрическому анализу для определения характеристик указанного по меньшей мере одного отличающегося зарядом варианта указанного белка, представляющего интерес.

16. Способ по п. 15, где градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 600 мМ соли аммония.

17. Способ по п. 15, где градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 300 мМ соли аммония.

18. Способ по п. 15, где применяемый возрастающий градиент концентрации соли является линейным.

19. Способ по п. 18, где применяемый возрастающий градиент концентрации соли является линейным.

20. Способ по п. 15, дополнительно включающий отслеживание элюата из б) в отношении поглощения ультрафиолета и сбор указанной по меньшей мере одной фракции, которая элюируется до или после элюирования белка, представляющего интерес.

21. Способ по п. 15, где белок, представляющий интерес, имеет значение pI более чем около 6,2.

22. Способ по п. 15, где по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант представляет собой соединения, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования, глюкуронирования, высокомолекулярные соединения, соединения с С-концевым лизином или гликозилированные соединения белка, представляющего интерес.

23. Способ по п. 15, дополнительно включающий обработку указанного образца в условиях, обеспечивающих расщепление, перед загрузкой указанного образца в АЕХ-колонку.

24. Способ по п. 15, где условия, обеспечивающие расщепление, включают применение IdeS или его варианта.

25. Способ по п. 15, где масс-спектрометр осуществляет анализ в нативных условиях.

26. Способ определения характеристик по меньшей мере одного отличающегося зарядом варианта белка, представляющего интерес, включающий:

а) подвергание образца, содержащего белок, представляющий интерес, и по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант, условиям, обеспечивающим расщепление, и условиям, обеспечивающим дегликозилирование;

б) загрузку указанного образца в колонку для анионообменной хроматографии (АЕХ);

с) применение возрастающего градиента концентрации соли к загруженной анионообменной колонке для получения элюата;

д) сбор по меньшей мере одной фракции из с); и

е) подвергание указанной по меньшей мере одной фракции масс-спектрометрическому анализу для определения характеристик указанного по меньшей мере одного отличающегося зарядом варианта указанного белка, представляющего интерес.

27. Способ по п. 26, где масс-спектрометр осуществляет анализ в нативных условиях.

28. Способ по п. 26, где условия, обеспечивающие расщепление, включают применение IdeS или его варианта.

29. Способ по п. 26, где градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 600 мМ соли аммония.

30. Способ по п. 26, где градиент концентрации соли является градиентом элюирования и находится в диапазоне от около 10 мМ до около 300 мМ соли аммония.

31. Способ по п. 26, где применяемый возрастающий градиент концентрации соли является линейным.

32. Способ по п. 30, где применяемый возрастающий градиент концентрации соли является линейным.

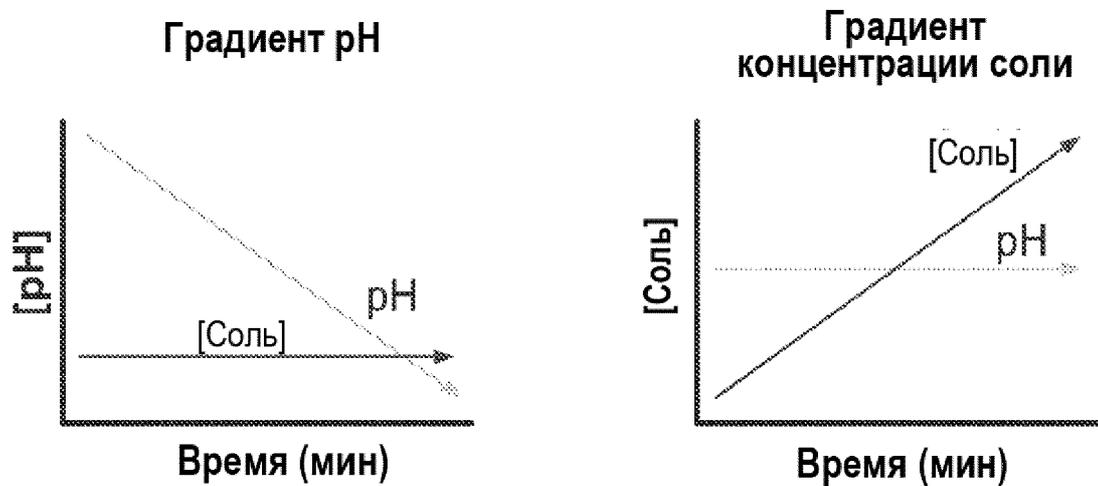
33. Способ по п. 26, дополнительно включающий отслеживание элюата из б) в отношении поглощения ультрафиолета и сбор указанной по меньшей мере одной фракции, которая элюируется до или после элюирования белка, представляющего интерес.

34. Способ по п. 26, где белок, представляющий интерес, имеет значение pI более чем около 6,2.

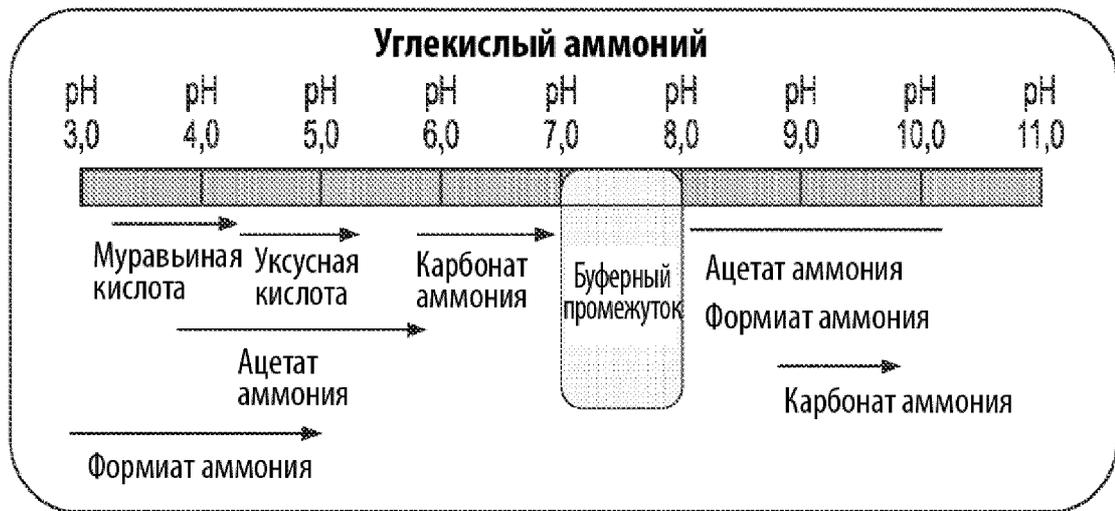
35. Способ по п. 26, где по меньшей мере один отличающийся зарядом вариант представляет собой соединения, являющиеся продуктом дезамидирования, гликирования, глюкуронирования, высокомолекулярные соединения, соединения с C-концевым лизином или гликозилированные соединения белка, представляющего интерес.

36. Способ по п. 26, дополнительно включающий обработку указанного образца в условиях, обеспечивающих расщепление, перед загрузкой указанного образца в АЕХ-колонку.

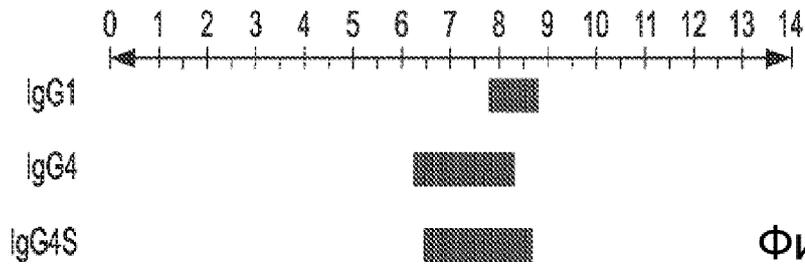
По доверенности



Фиг. 1



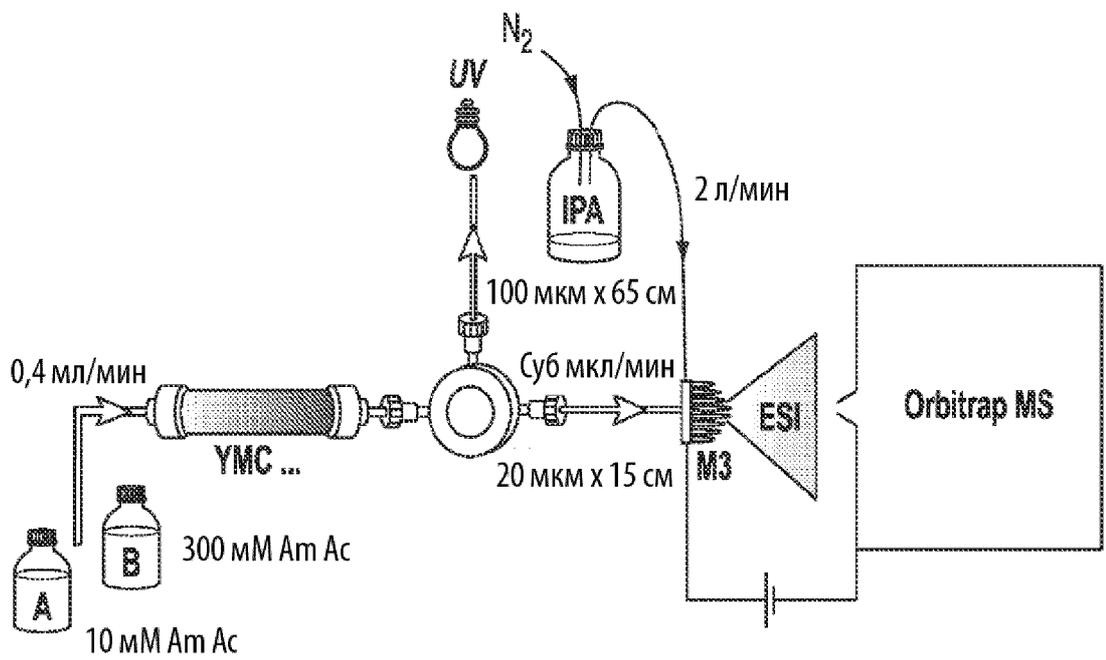
Фиг. 2А



mAb/bsAb	Изотип	pI
Ab1	IgG1	7,82
Ab2	IgG1	7,98
Ab3	IgG1	8,30
Ab4	IgG1	8,30
Ab5	IgG1	8,32
Ab6	IgG1	8,32
Ab7	IgG1	8,81
Ab8	IgG1	8,86
Ab9	IgG1	8,79
Ab10	IgG1	6,51
Ab11	IgG4S	6,62
Ab12	IgG4S	7,37
Ab13	IgG4S	7,59
Ab14	IgG4S	7,66
Ab15	IgG4S	8,59
Ab16	IgG4S	8,67

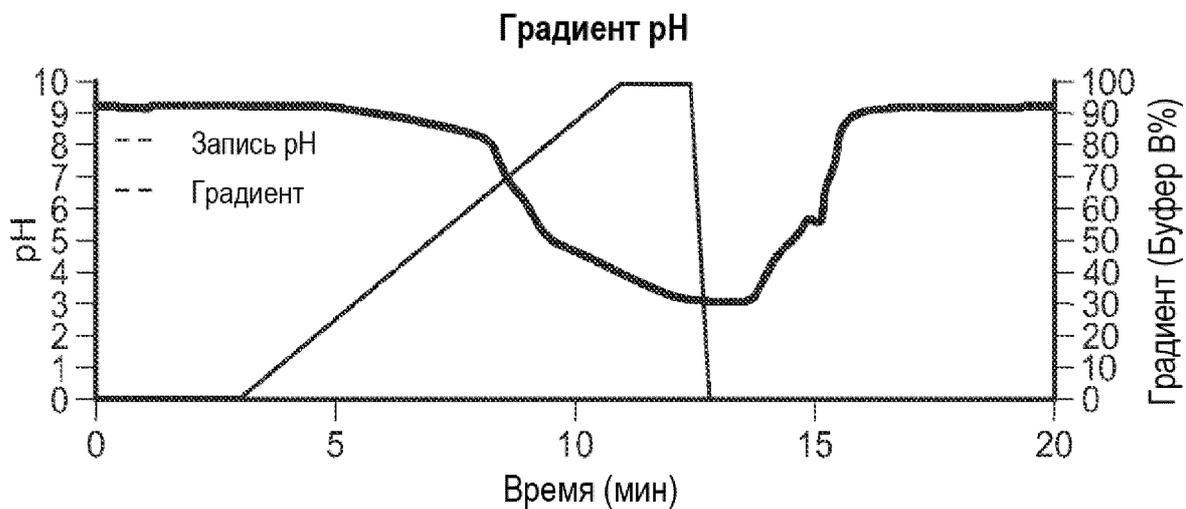
mAb/bsAb	Изотип	pI
Ab17	IgG4	6,28
Ab18	IgG4	6,42
Ab19	IgG4	6,57
Ab20	IgG4	6,82
Ab21	IgG4	6,82
Ab22	IgG4	6,86
Ab23	IgG4	6,86
Ab24	IgG4	6,87
Ab25	IgG4	6,92
Ab26	IgG4	7,33
Ab27	IgG4	7,60
Ab28	IgG4	7,82
Ab29	IgG4	7,89
Ab30	IgG4	8,02

Фиг. 2С



Фиг. 3

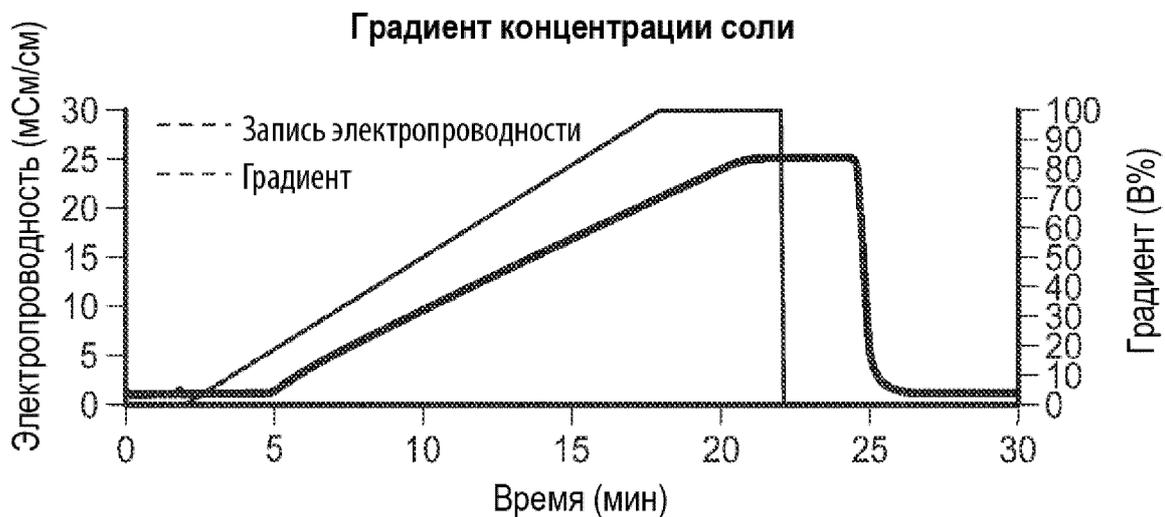
4/27



MPA: 10 мМ ацетат аммония, рН 9,0

MPB: 50 мМ аммиак, рН 5,5

Фиг. 4А

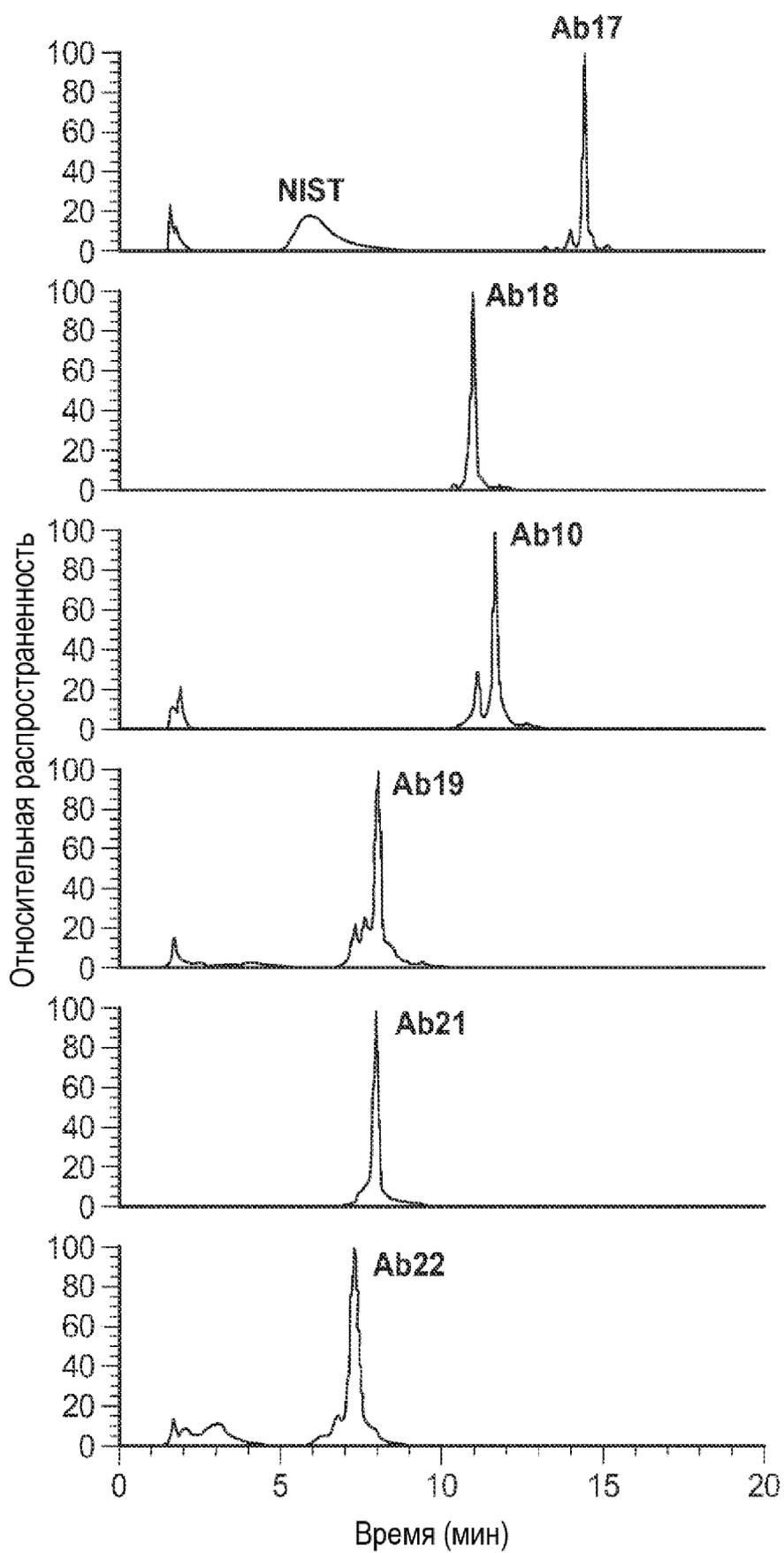


MPA: 10 мМ ацетат аммония

MPB: 300 мМ ацетат аммония

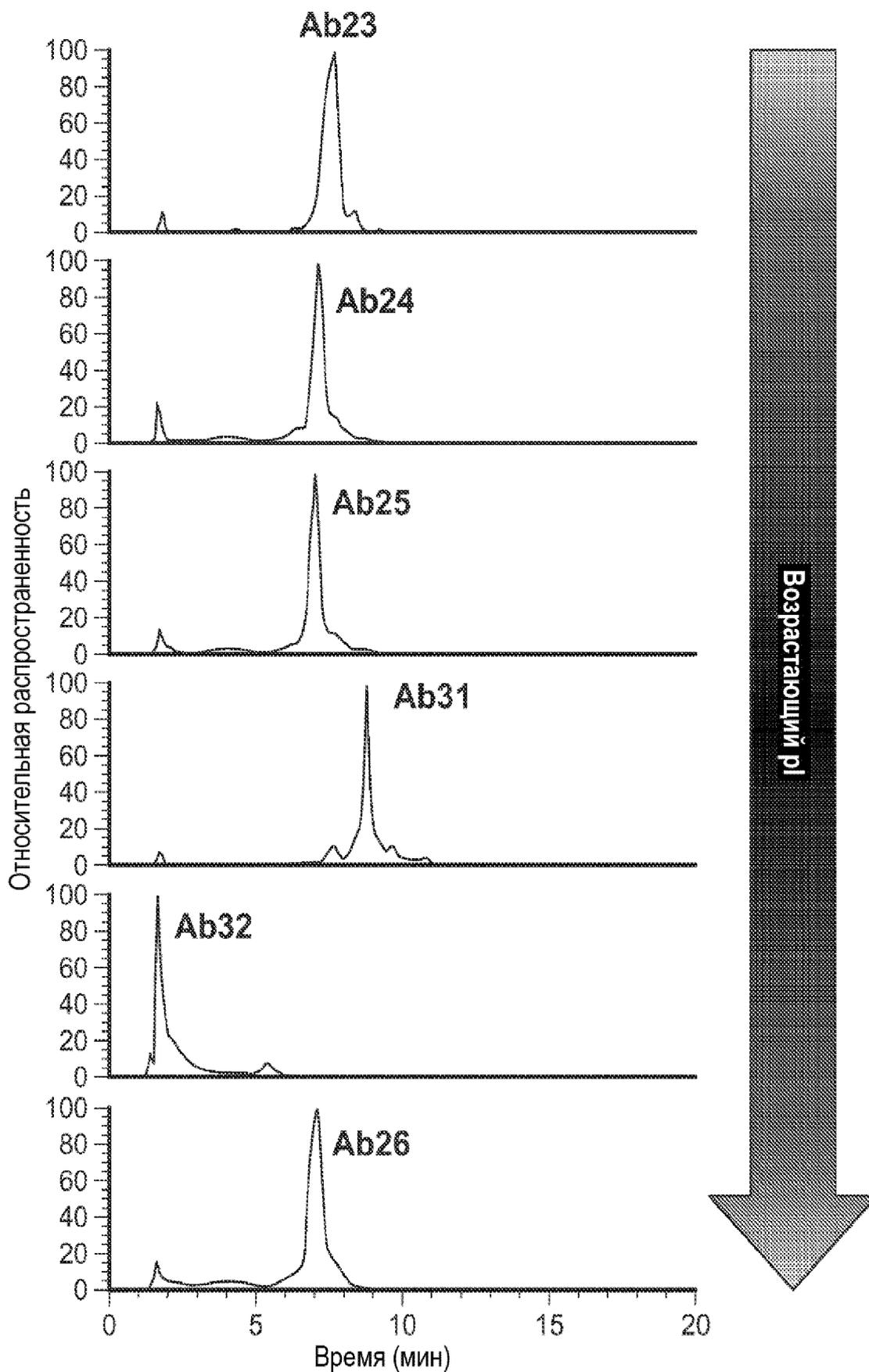
Фиг. 4В

5/27

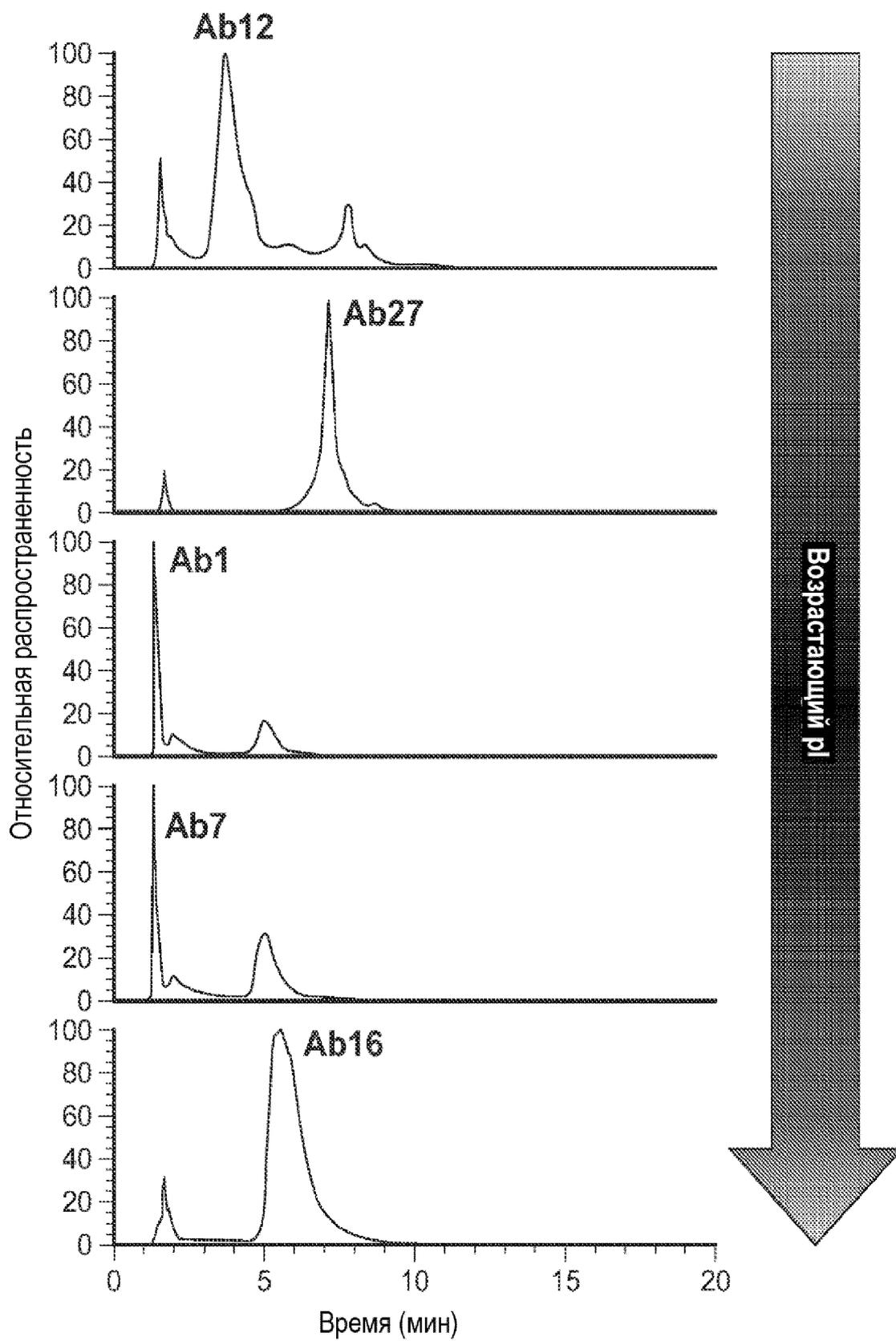


Фиг. 5А

6/27



Фиг. 5В



Фиг. 5С

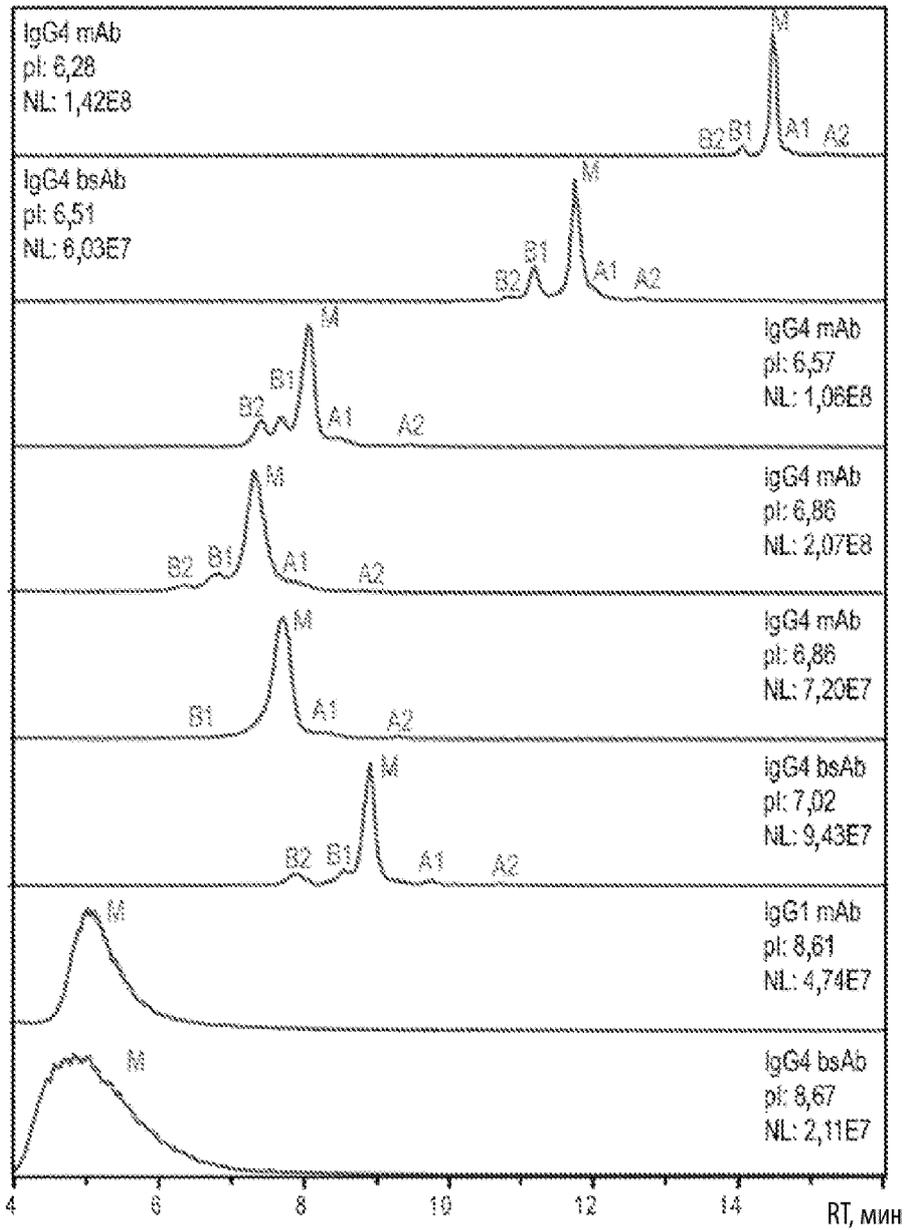
mAb	pI	AEX-разделение
Ab17	6,28	Надлежащее
Ab18	6,42	Надлежащее
Ab10	6,51	Надлежащее
Ab19	6,57	Надлежащее
Ab21	6,82	Надлежащее
Ab22	6,86	Надлежащее
Ab23	6,86	В некоторой степени
Ab24	6,87	В некоторой степени
Ab25	6,92	В некоторой степени
Ab31	7,02	В некоторой степени
Ab32	7,28	Неудовлетворительное
Ab26	7,33	В некоторой степени
Ab12	7,37	Неудовлетворительное
Ab27	7,60	В некоторой степени
Ab1	7,82	Неудовлетворительное
Ab7	8,61	Неудовлетворительное
NISTmAb	8,64	Неудовлетворительное
Ab16	8,67	Неудовлетворительное

Фиг. 5D

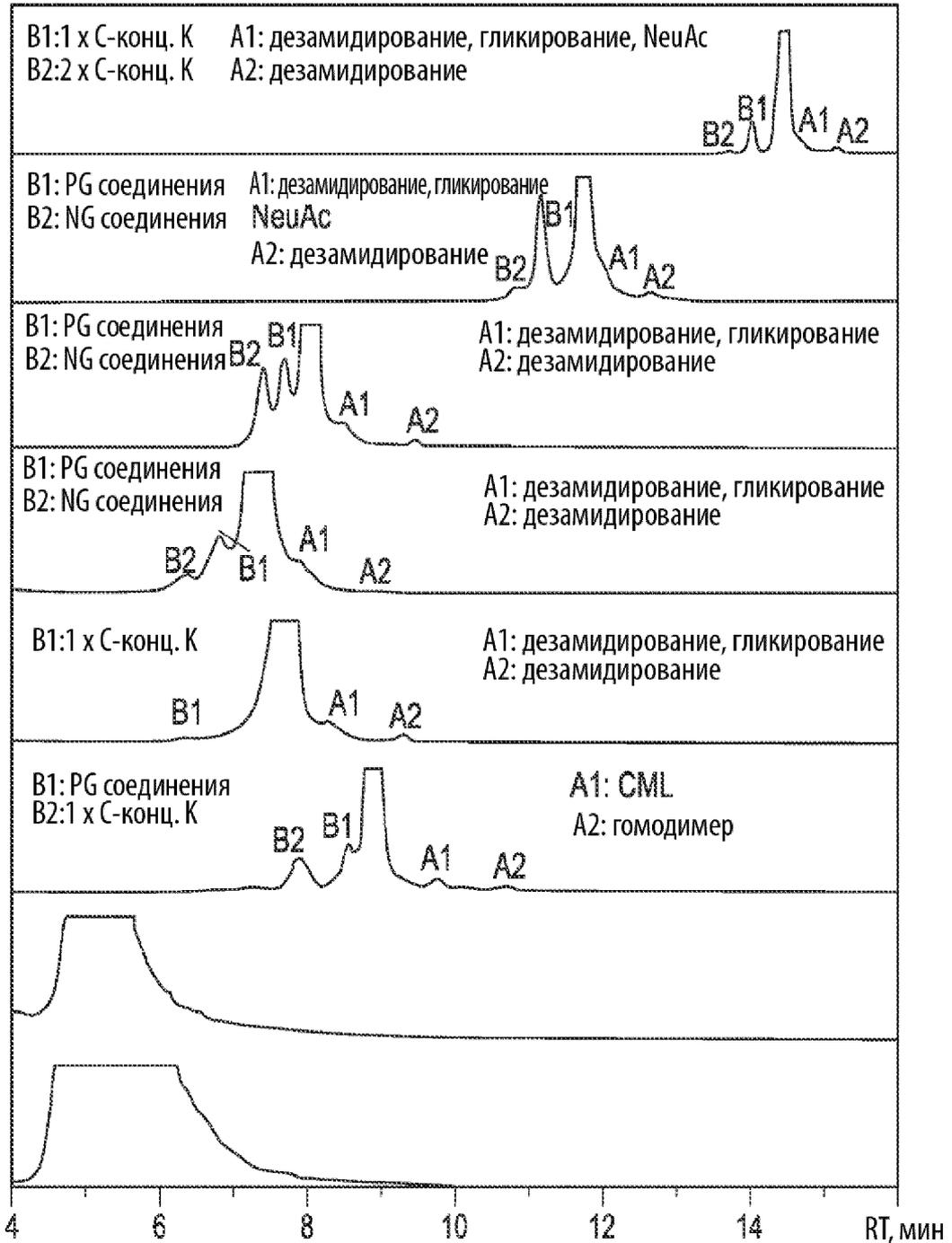
9/27

Фиг. 6А

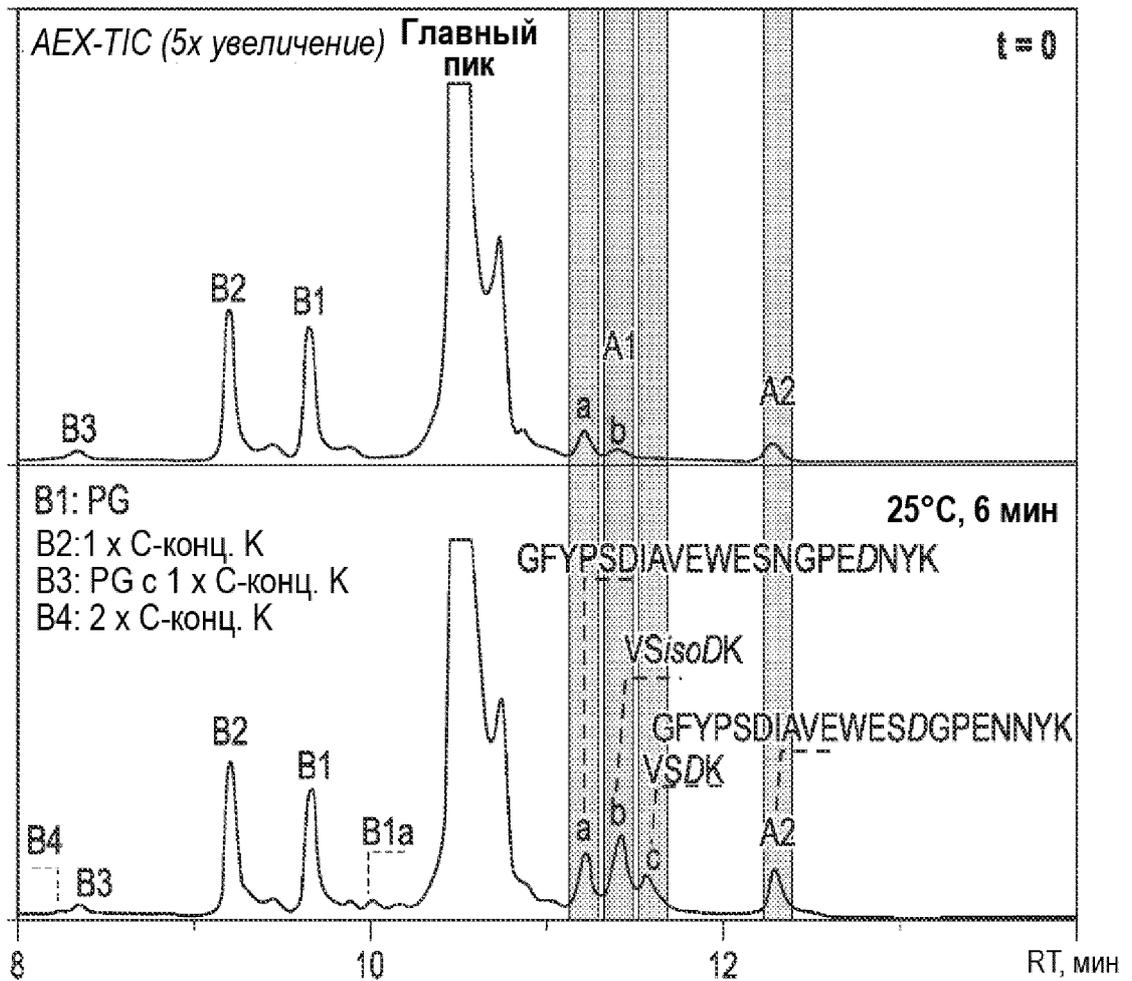
АЕХ-ТIC, полный масштаб



AEX-TIC, 3 x увеличение

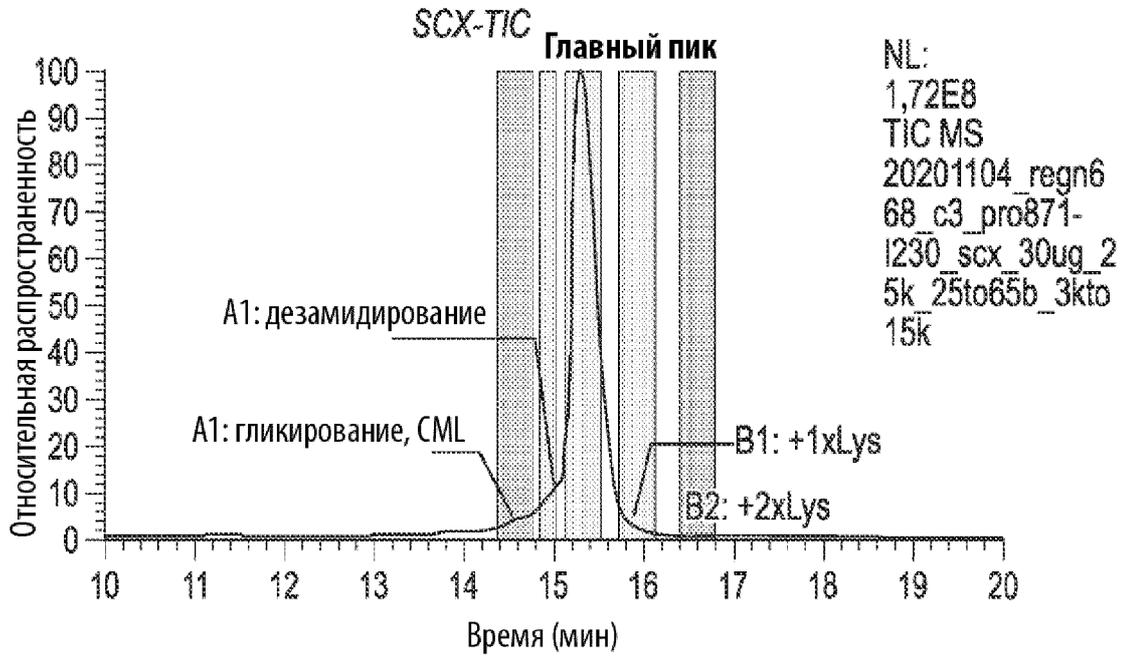


Фиг. 6В

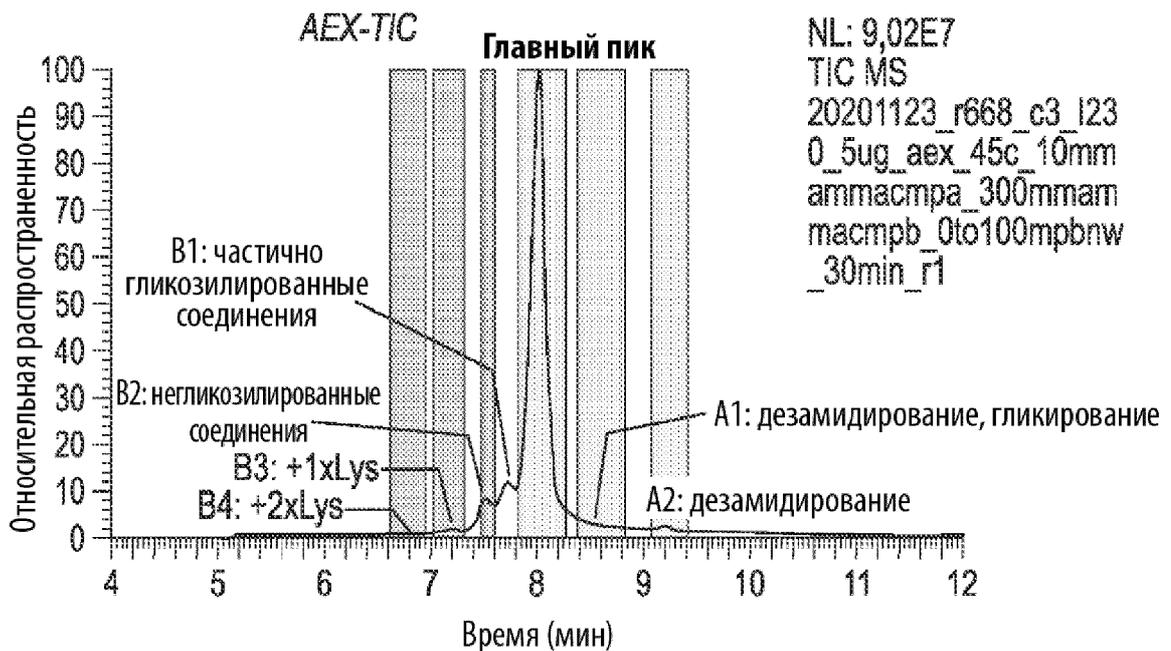


Фиг. 7

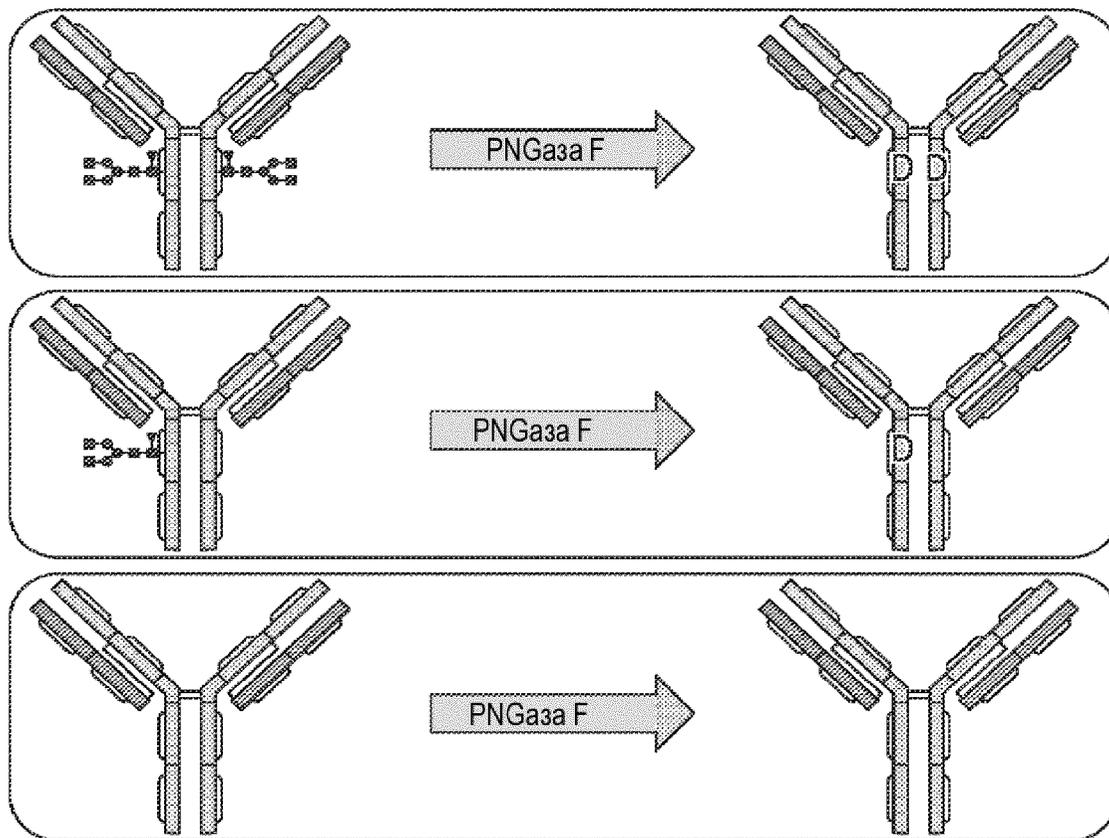
12/27



Фиг. 8А



Фиг. 8В



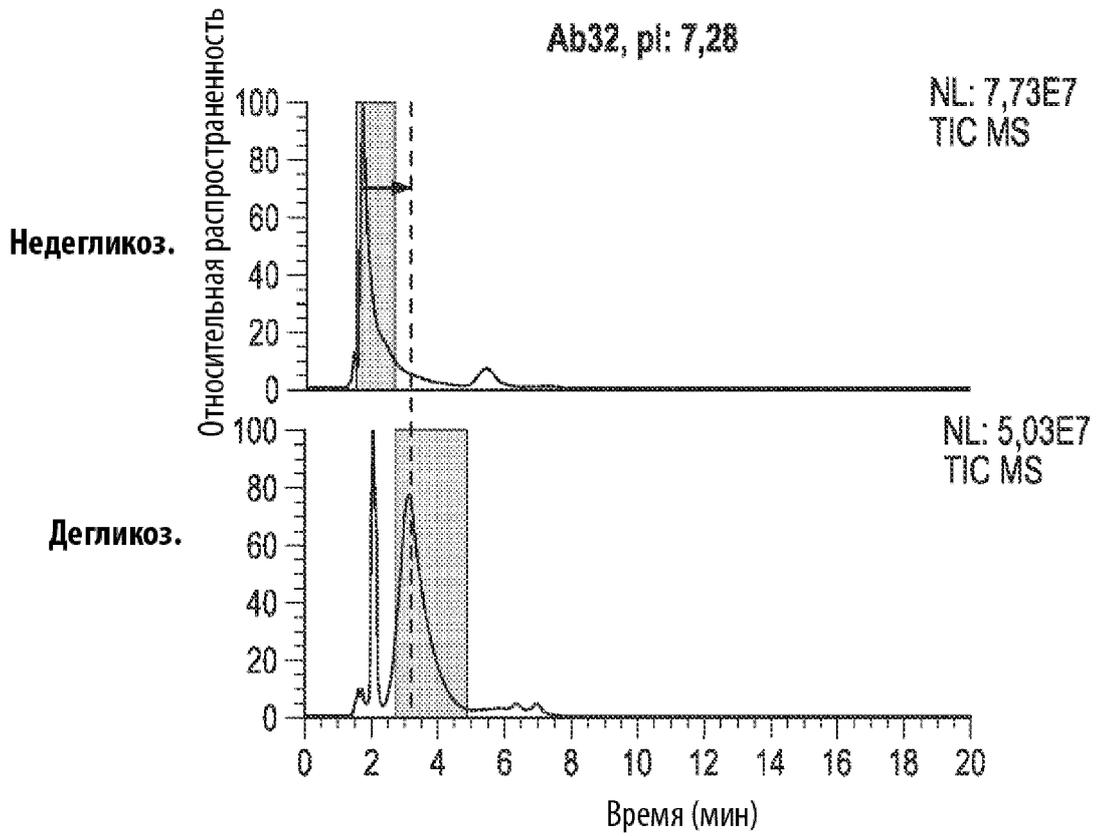
2 N → D превращение
из полностью гликозилированных соединений
(FG)

1 N → D превращение
из частично гликозилированных соединений
(PG)

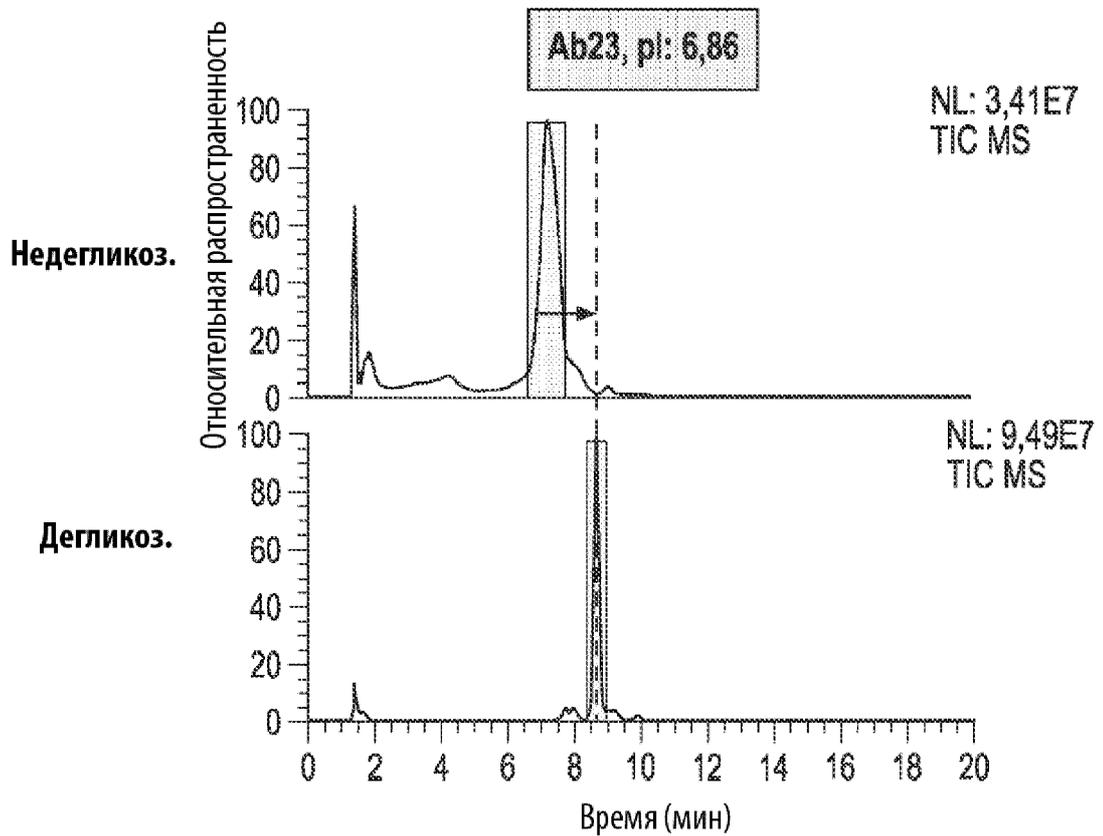
Негликозилированные соединения
(NG)

Фиг. 9

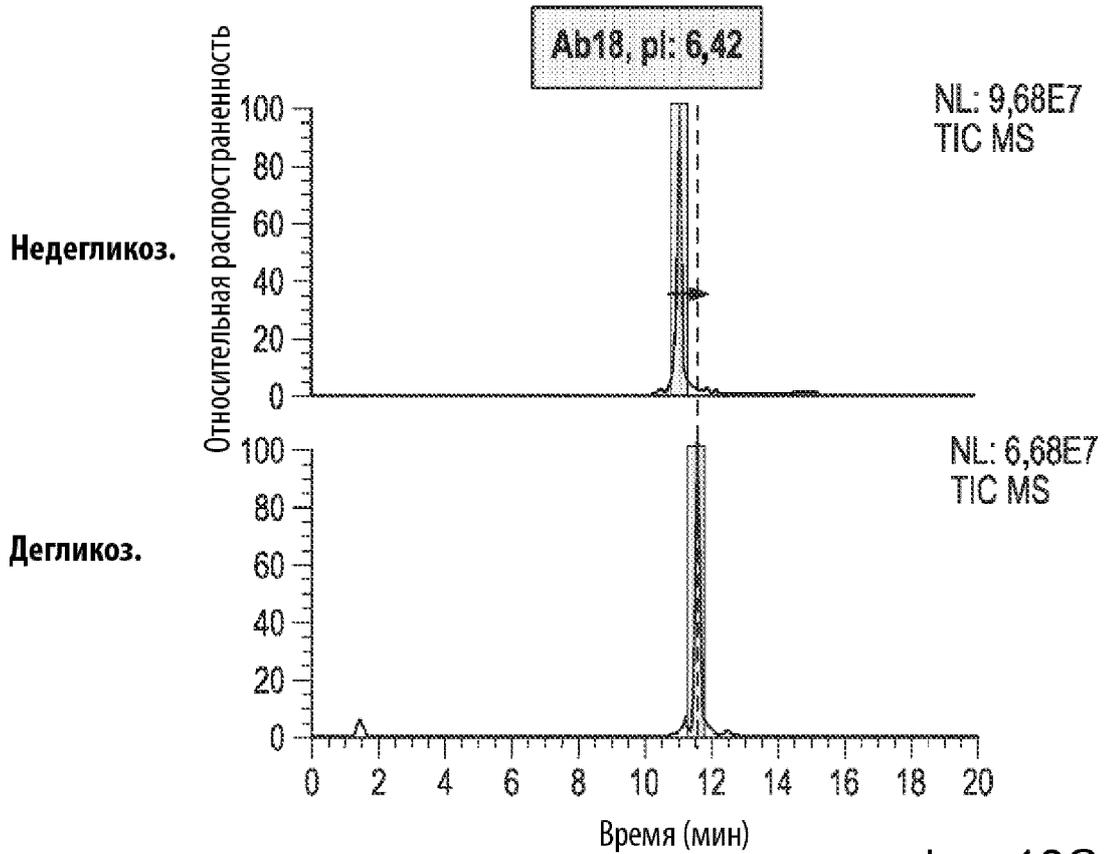
14/27



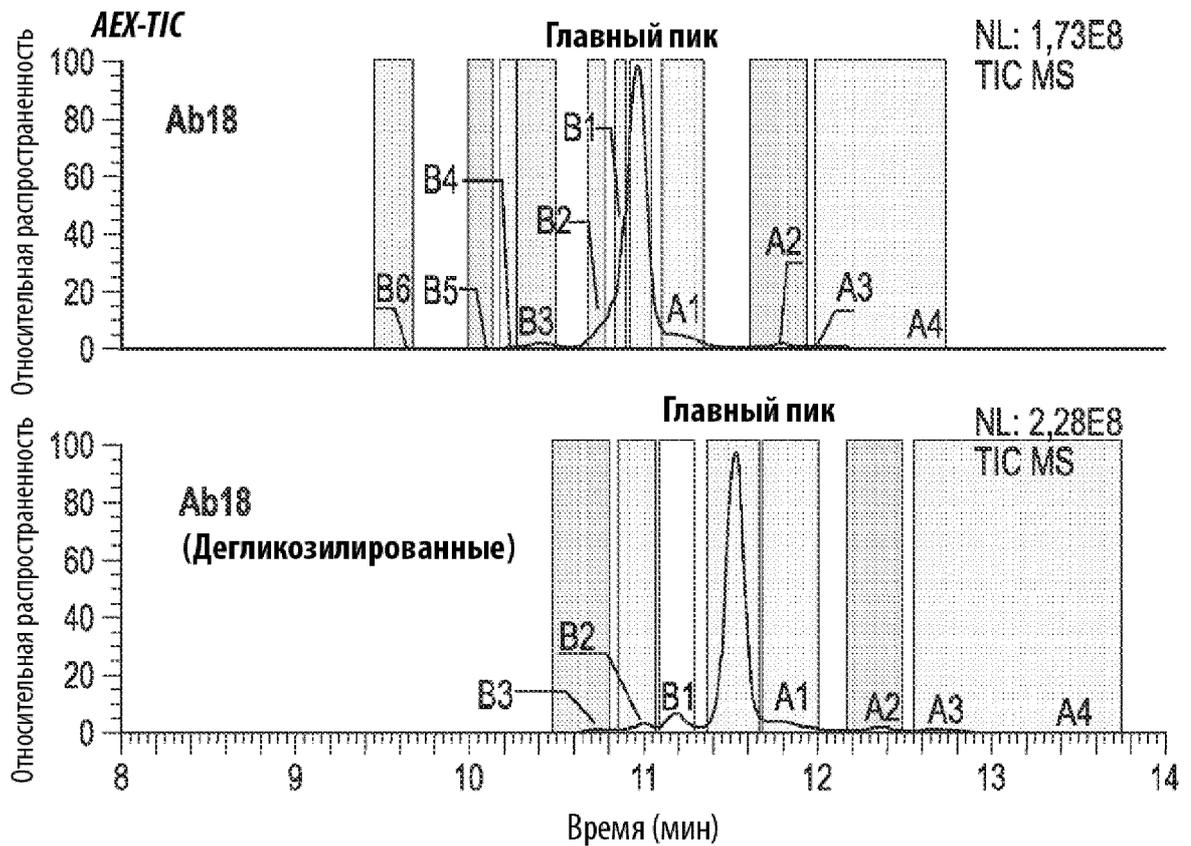
Фиг. 10А



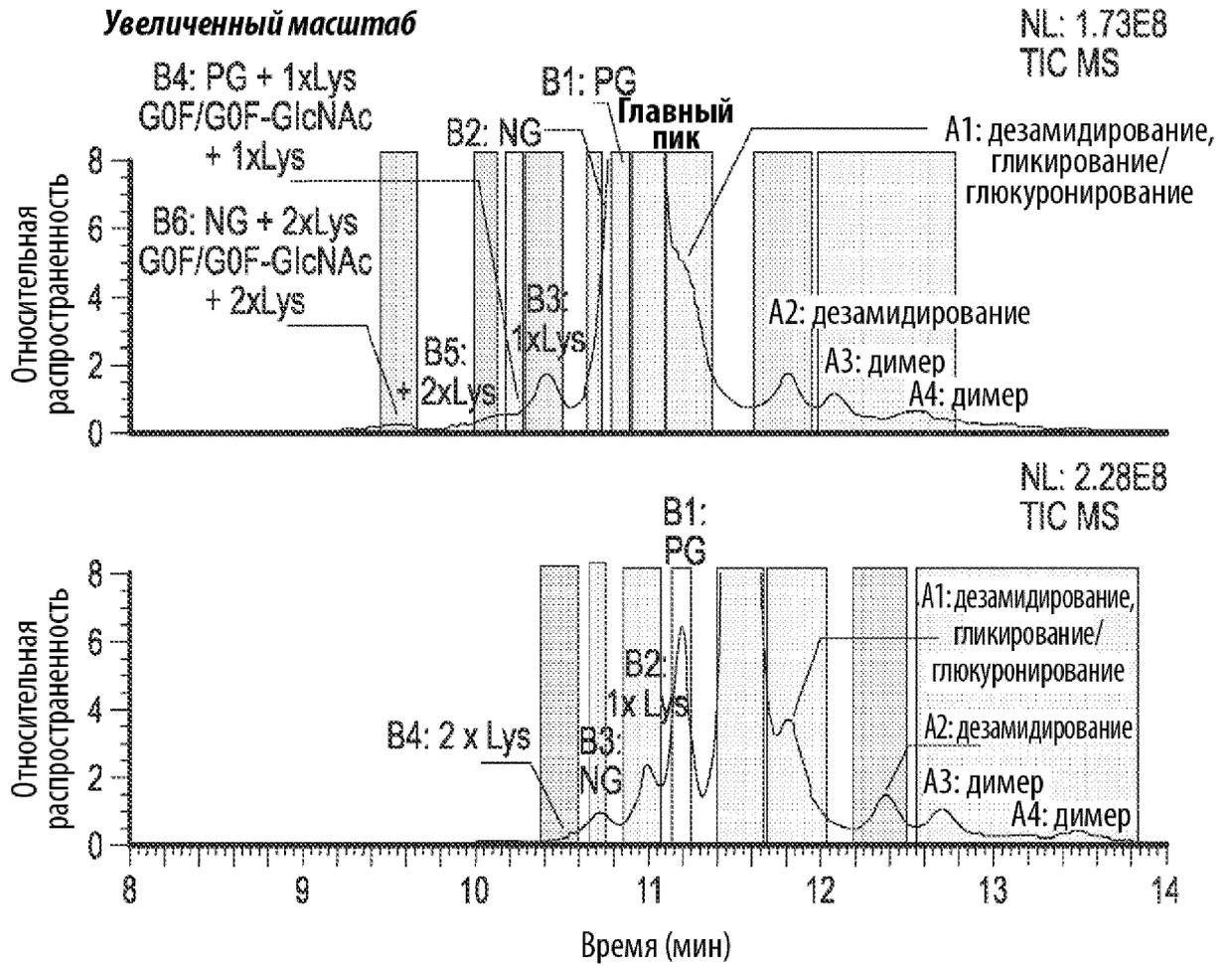
Фиг. 10В



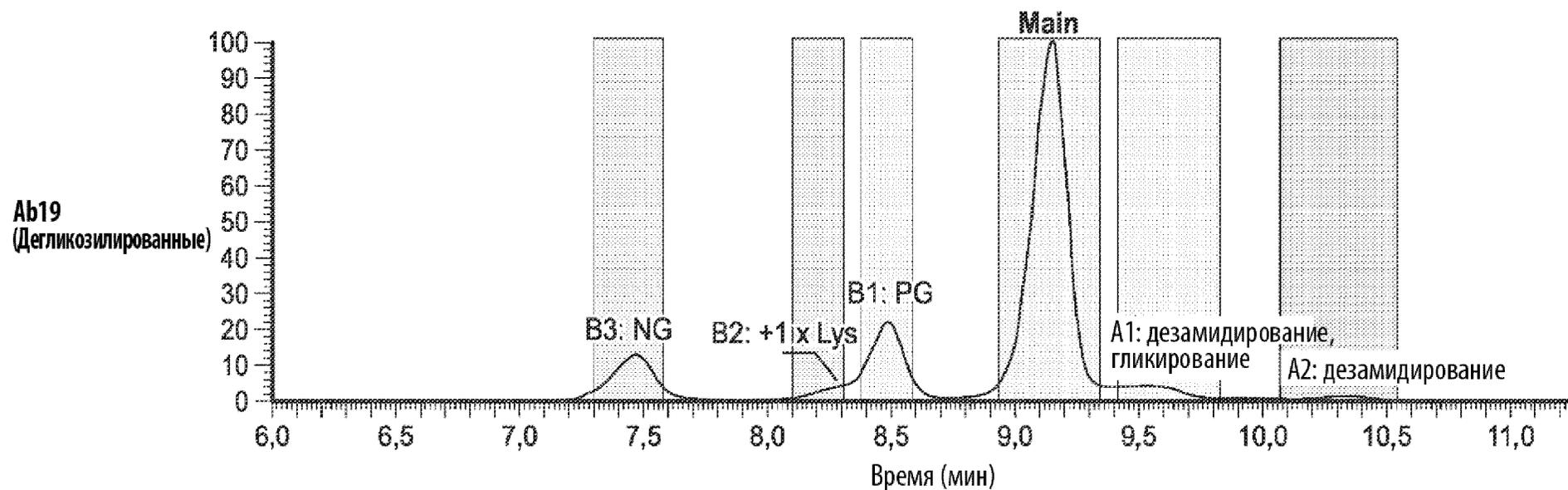
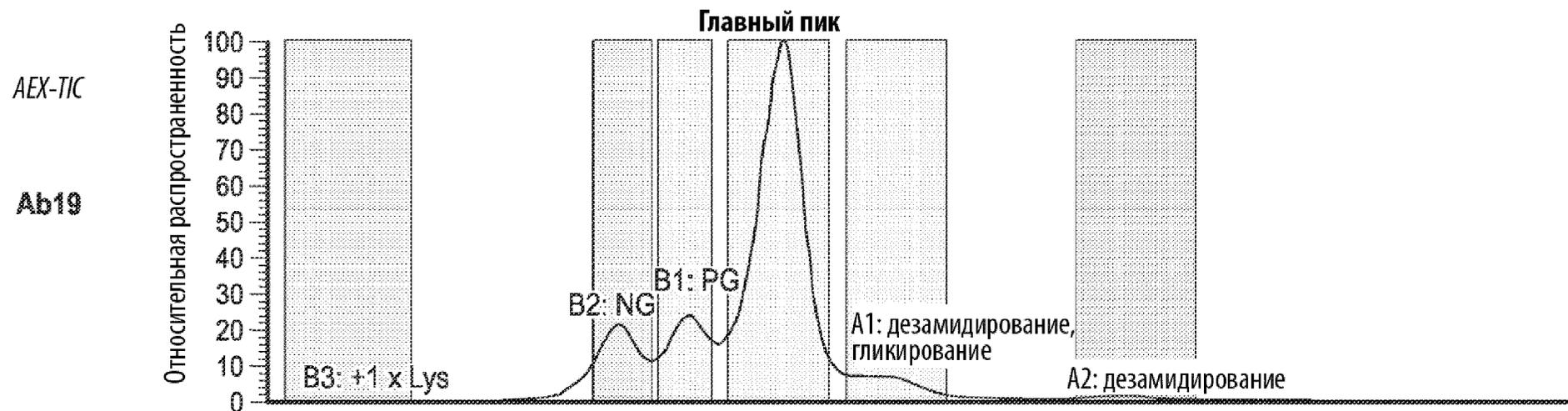
Фиг. 10С



Фиг. 11А

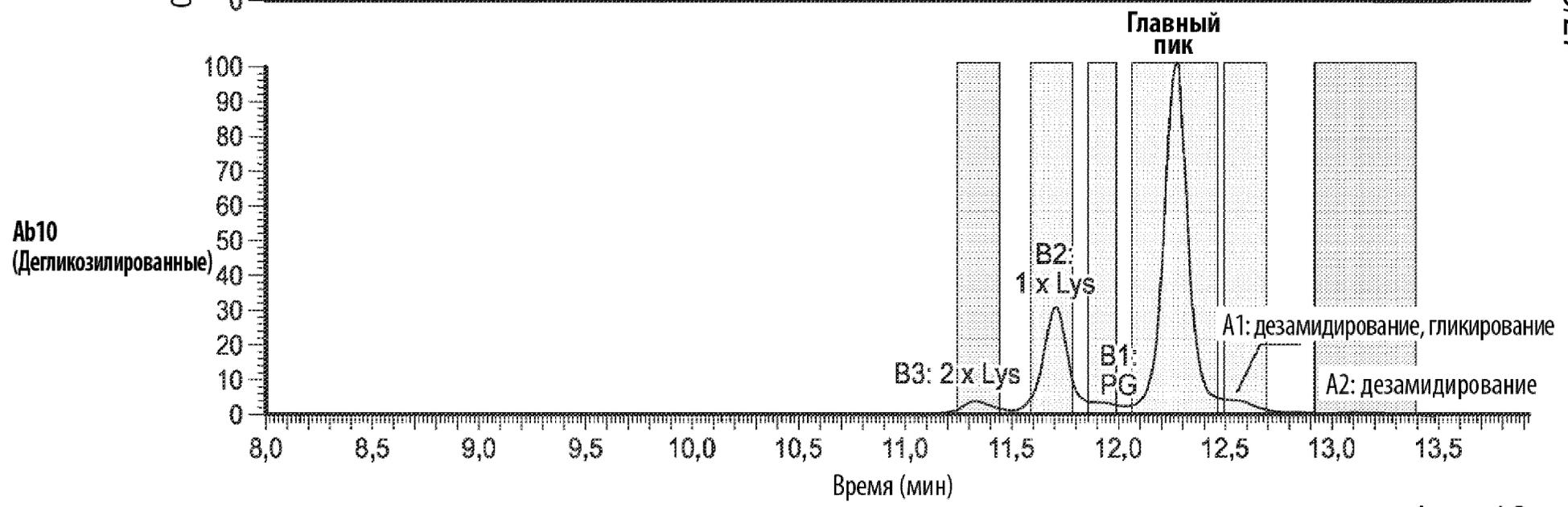
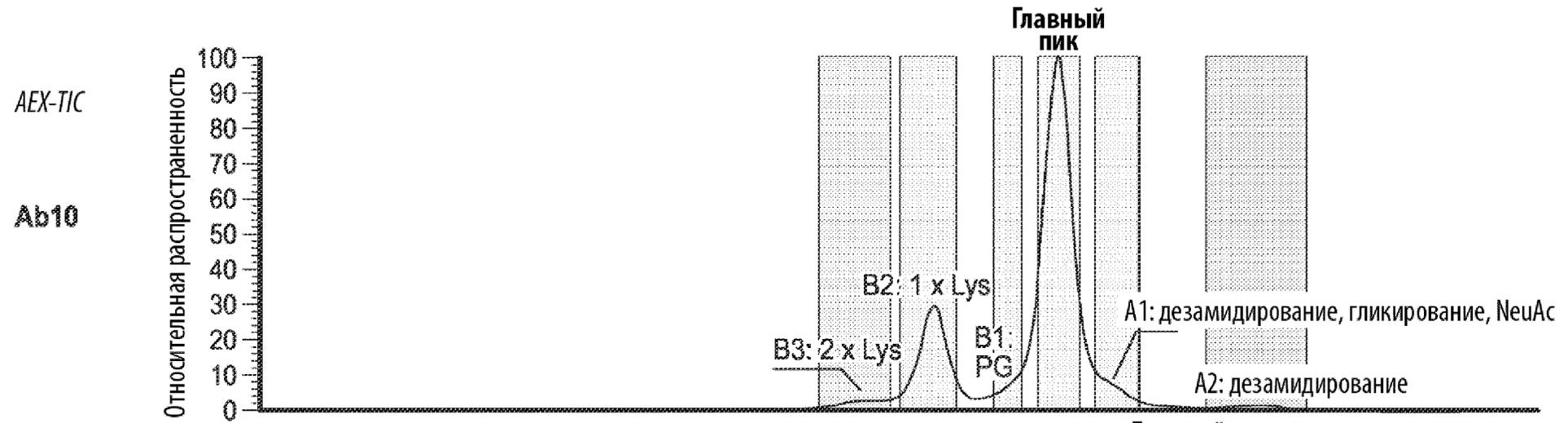


Фиг. 11В



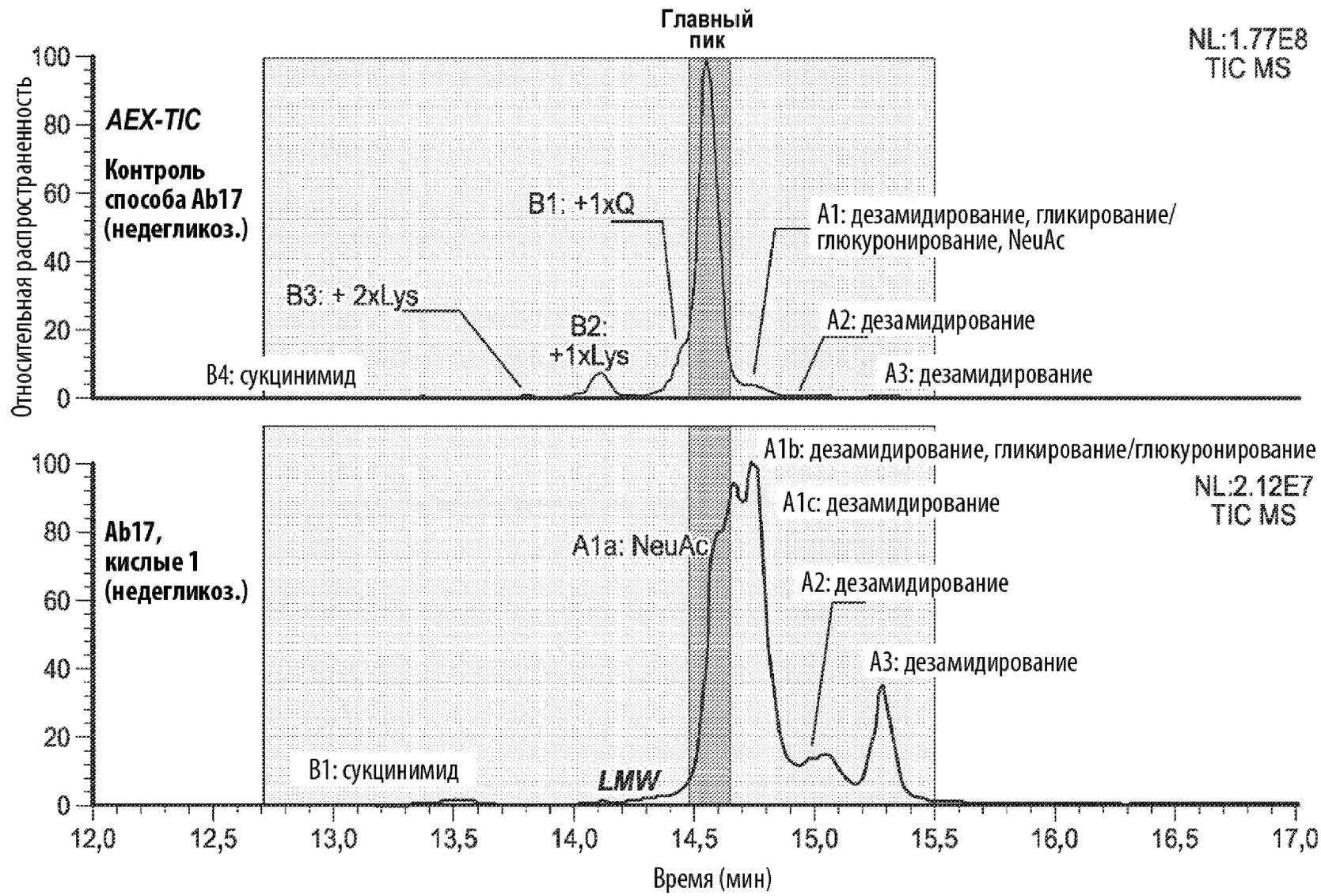
17/27

Фиг. 12



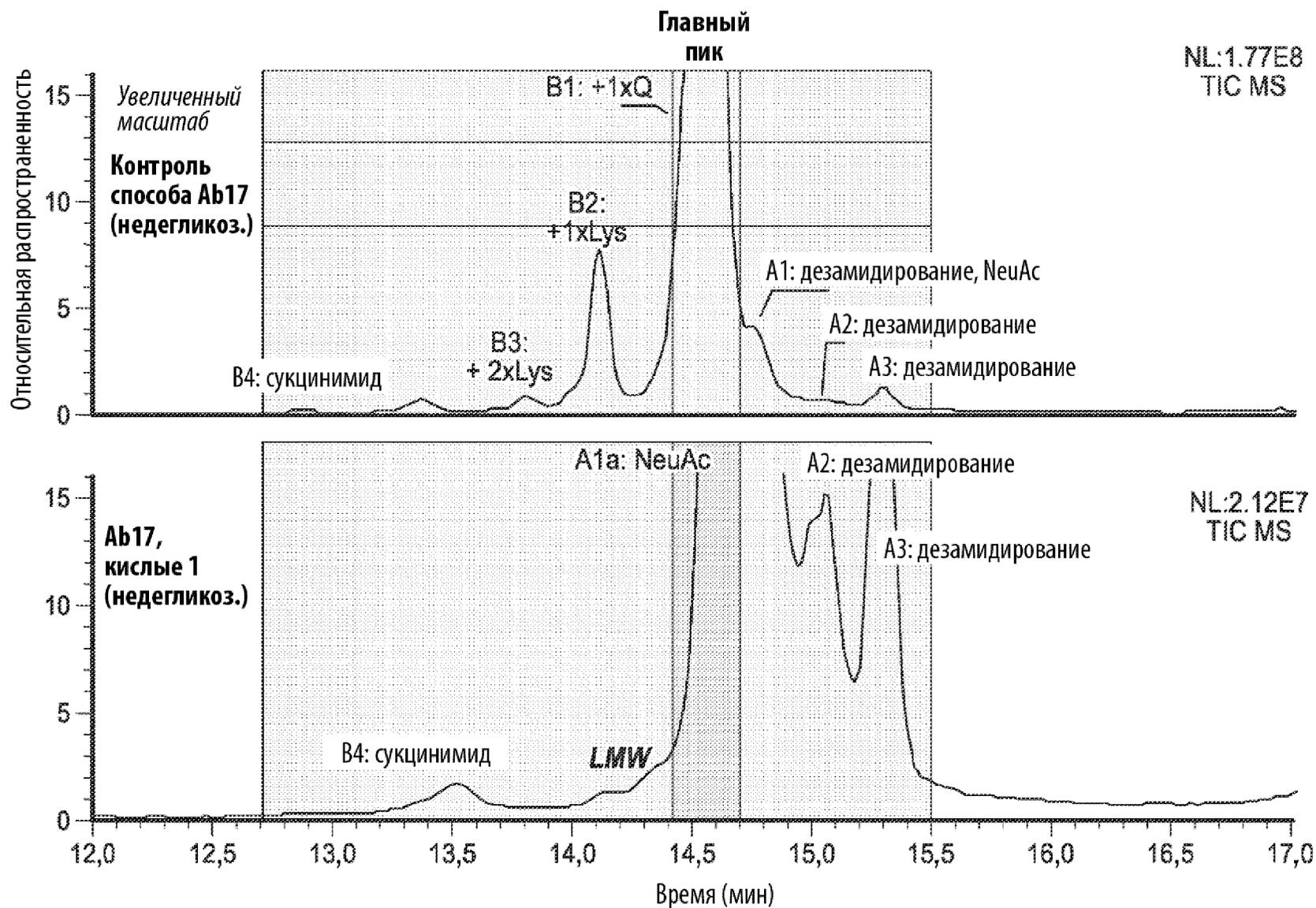
18/27

Фиг. 13



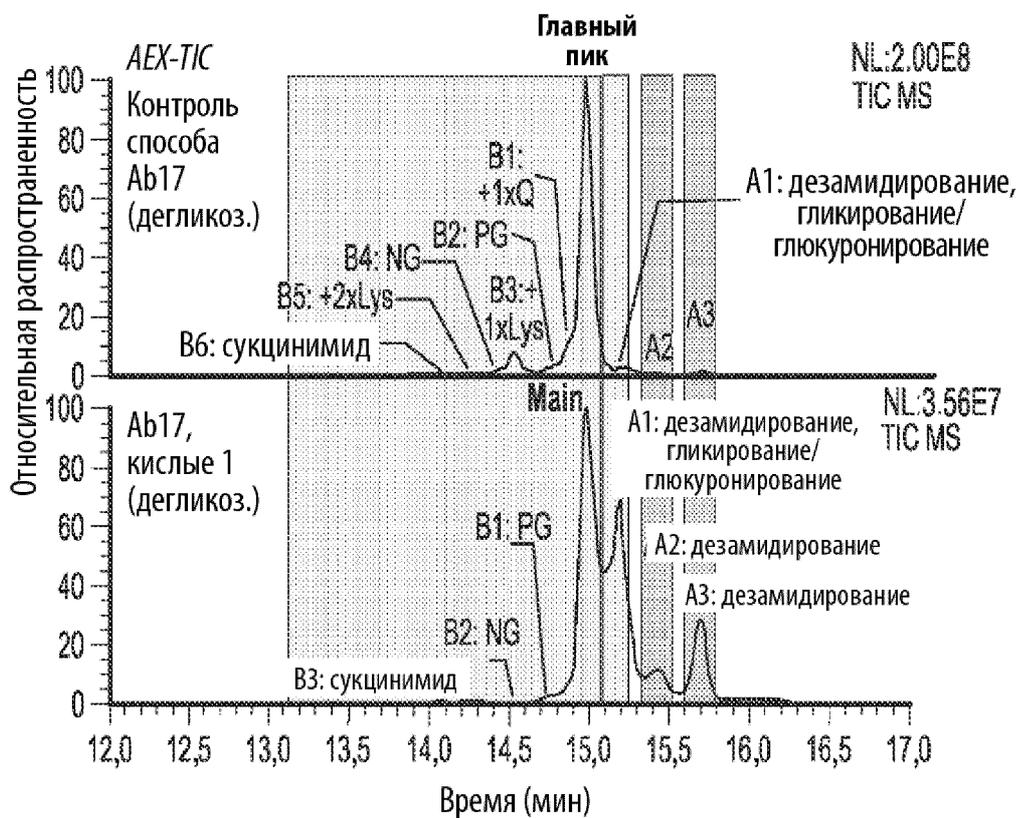
19/27

Фиг. 14А

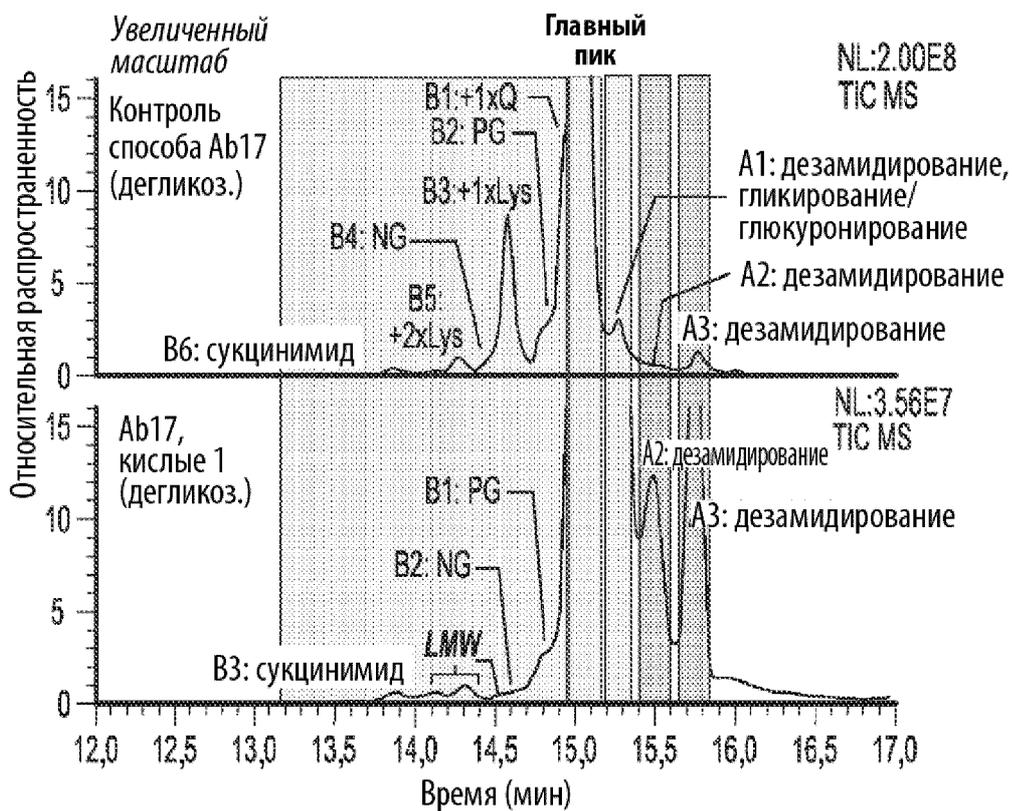


20127

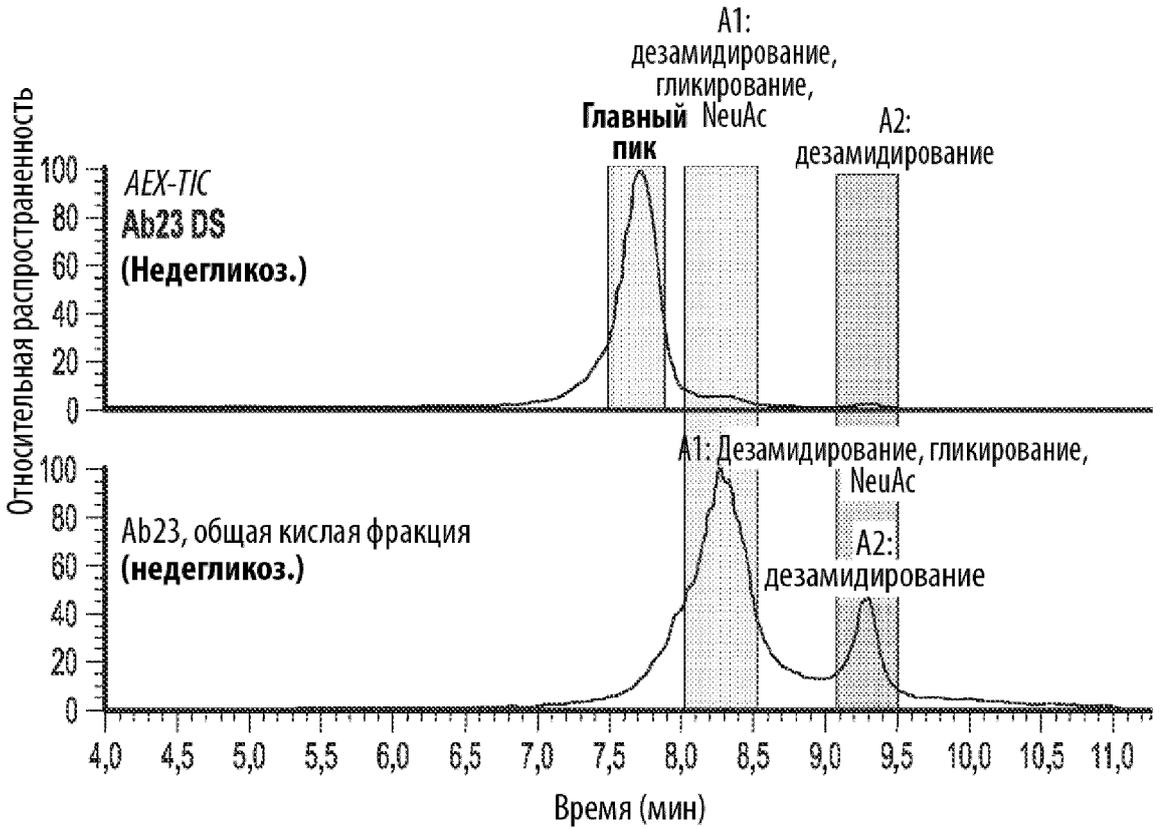
Фиг. 14В



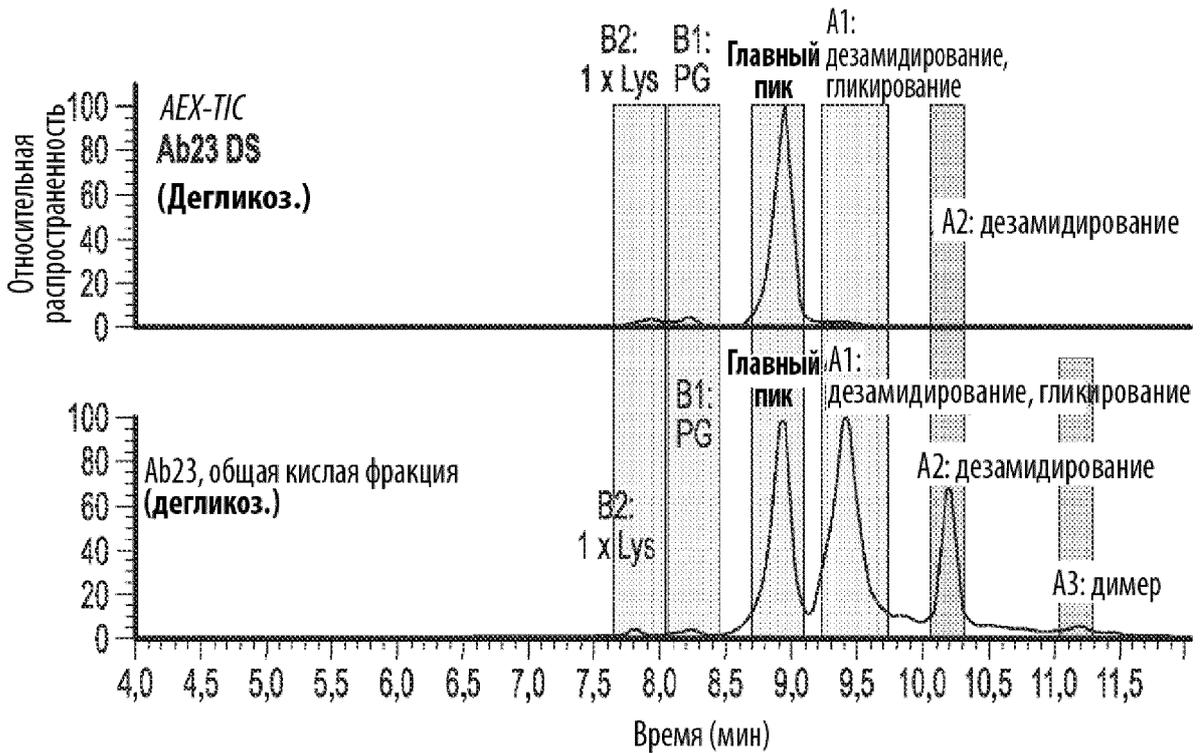
Фиг. 14С



Фиг. 14D



Фиг. 15А

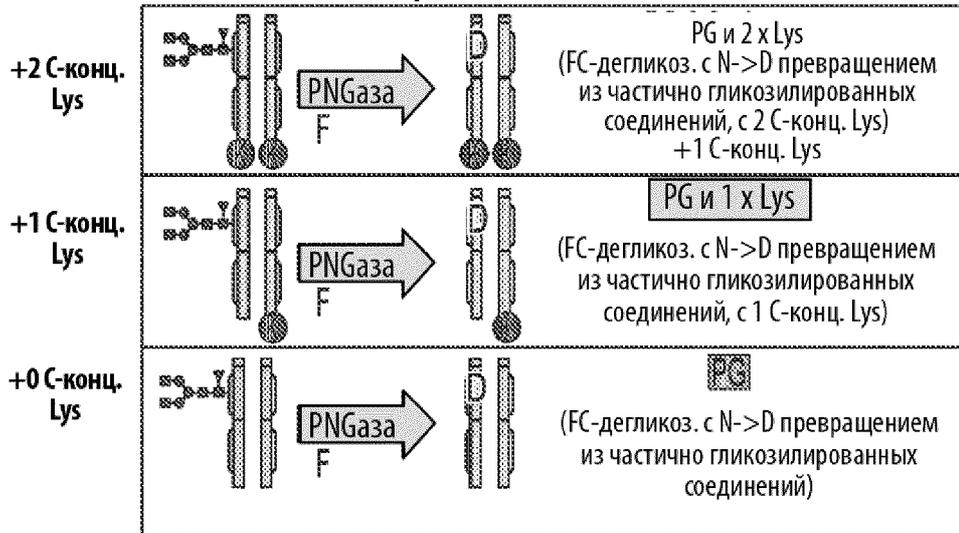


Фиг. 15В

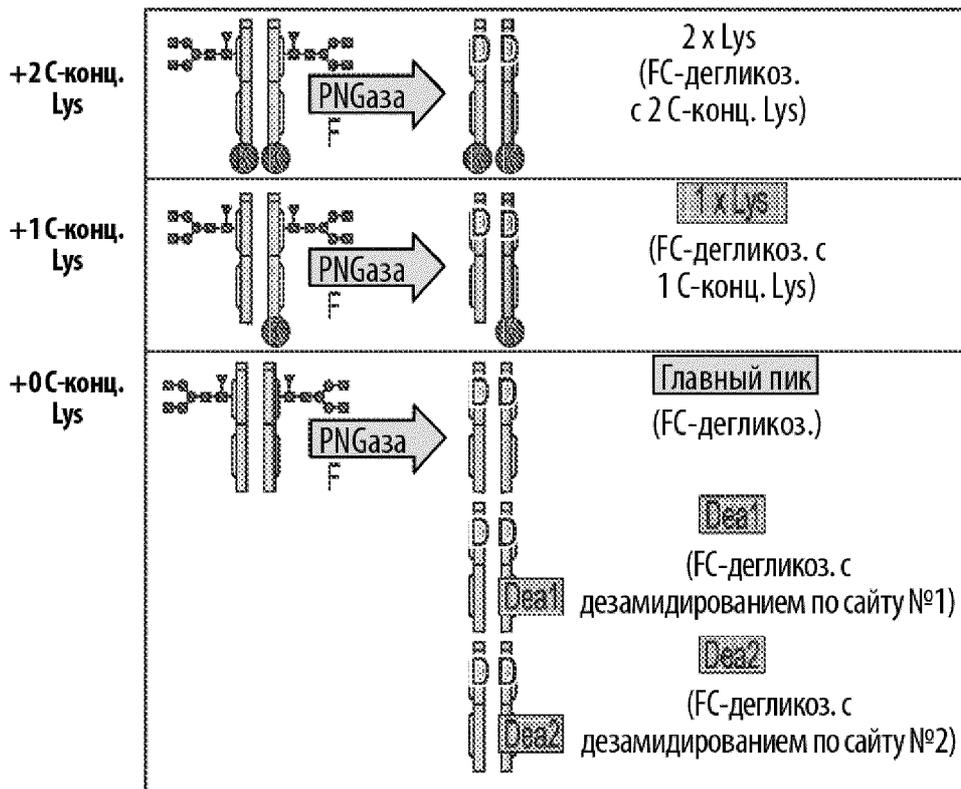
Негликозилированное мАб



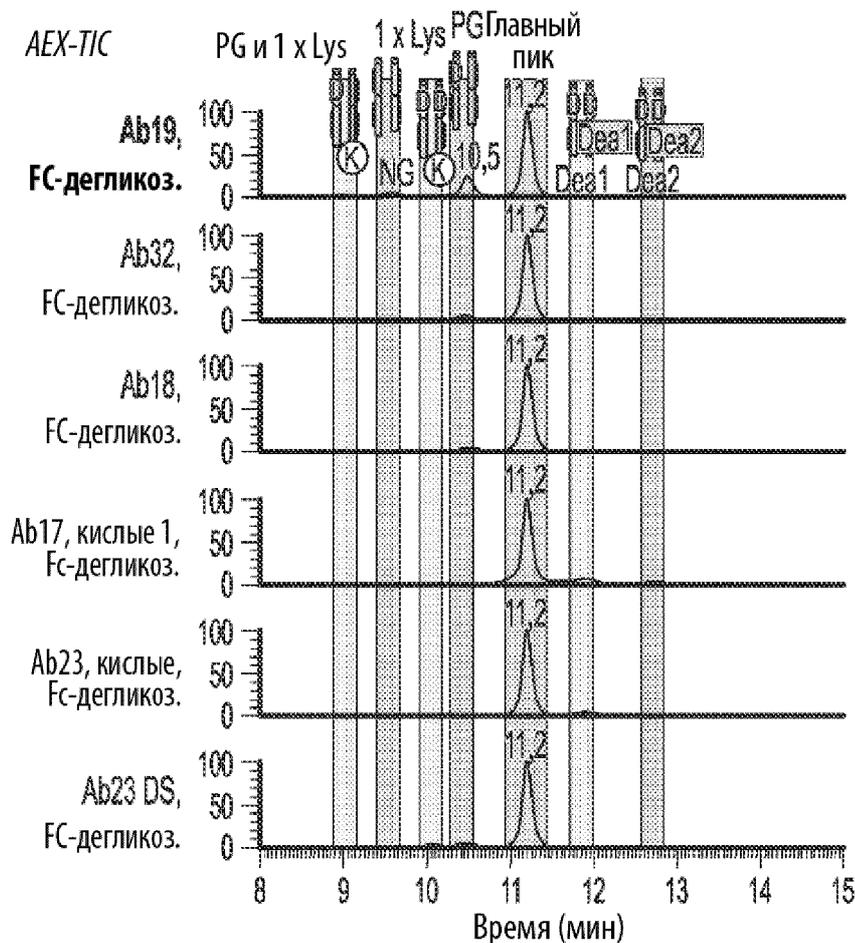
Частично гликозилированное мАб



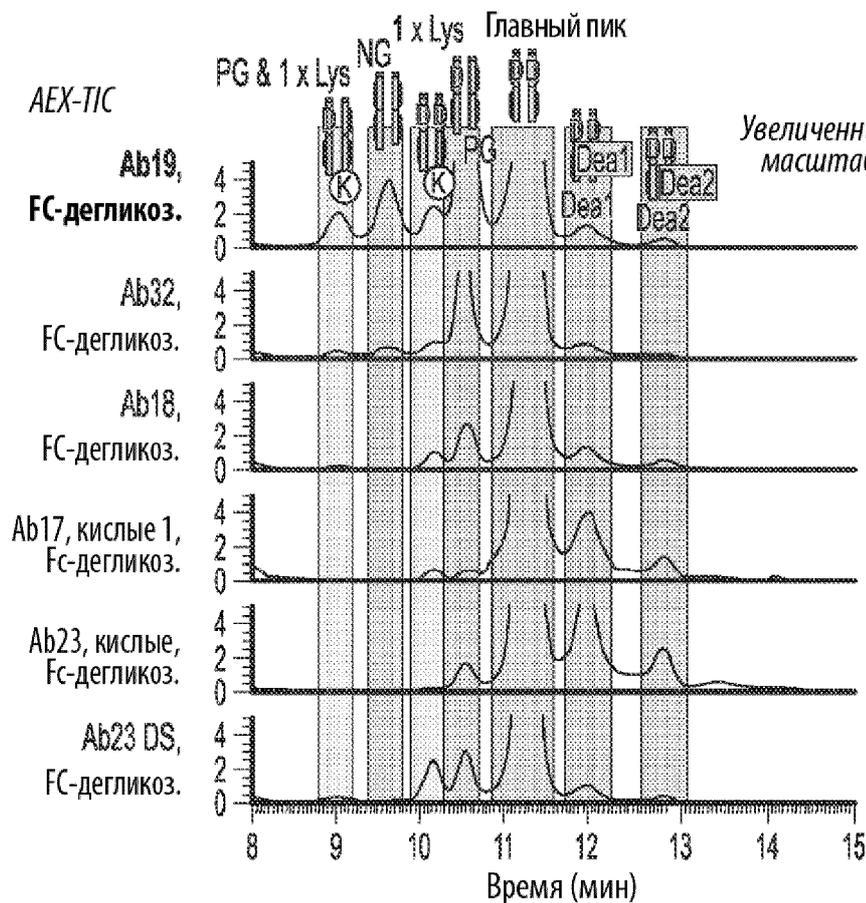
Полностью гликозилированное мАб



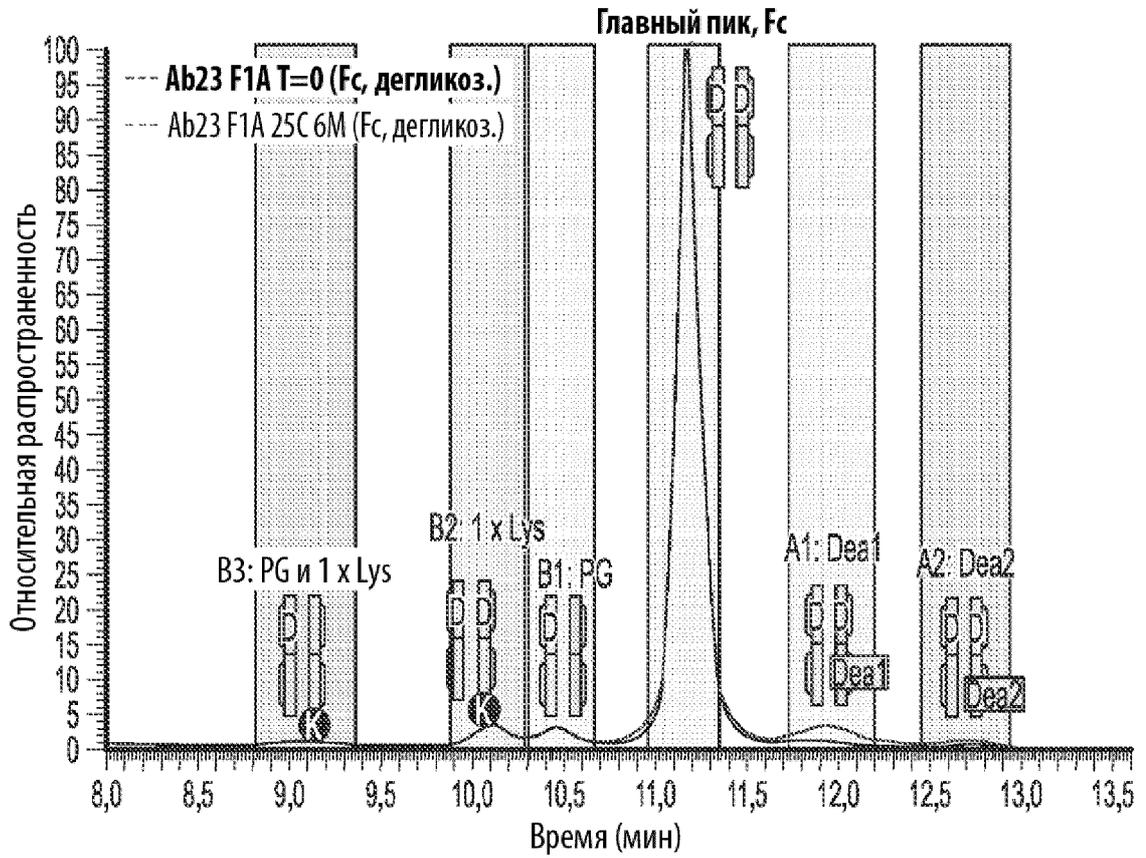
Фиг. 16



Фиг. 17А



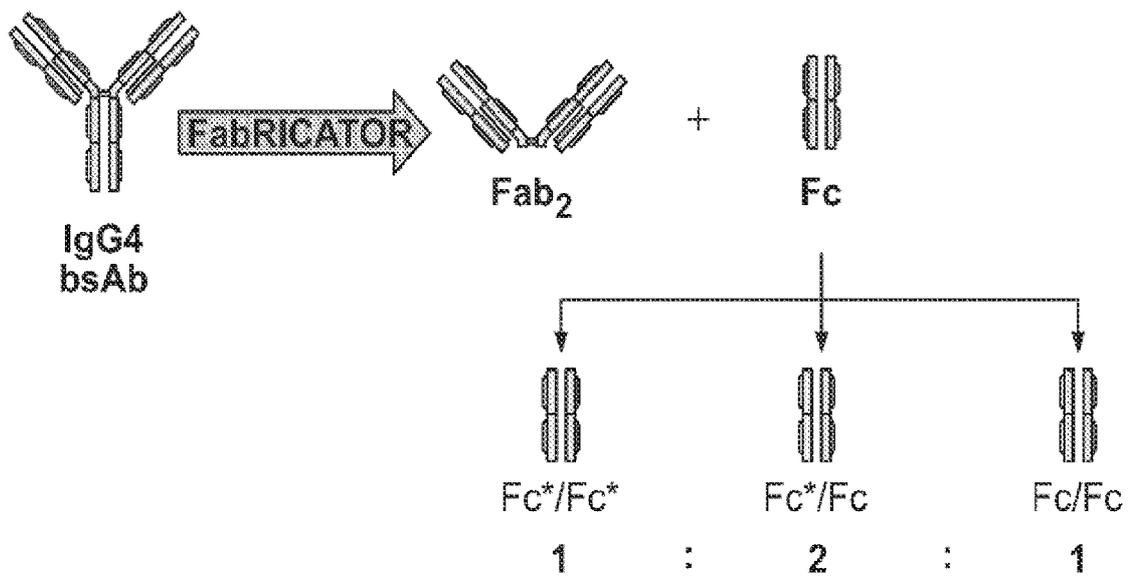
Фиг. 17В



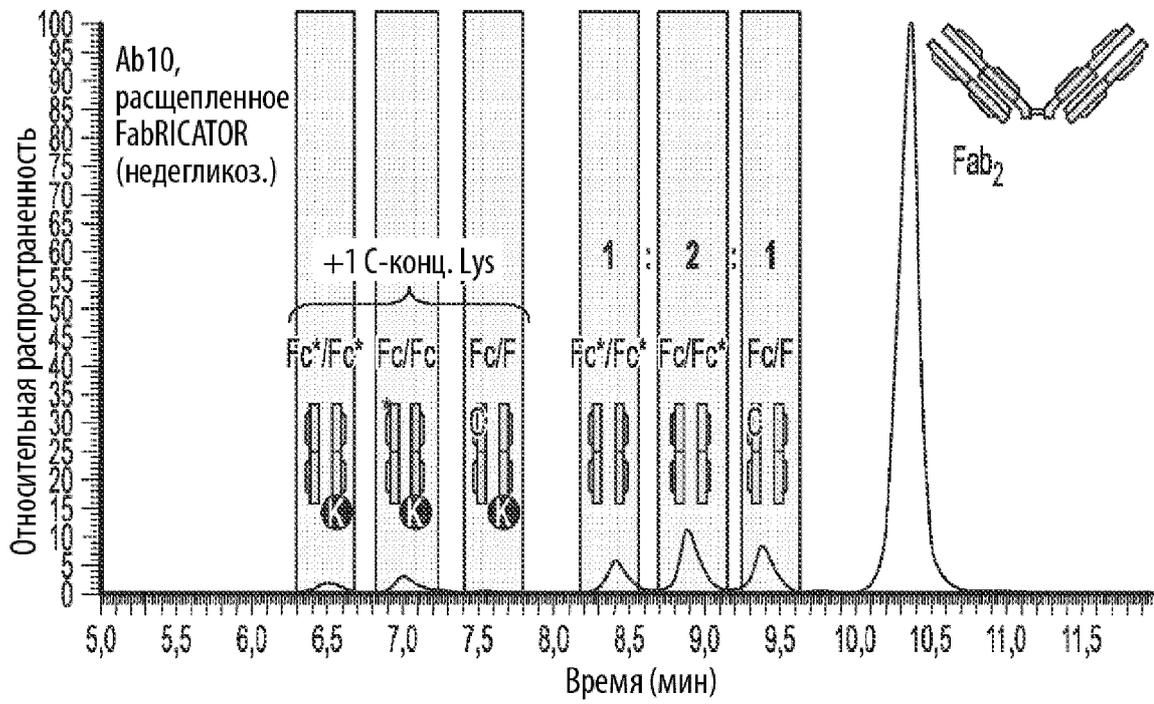
Фиг. 18А

Пик	Относительная распространенность (%)	
	T0	25C 6M
B3	0,9%	0,9%
B2	2,3%	2,5%
B1	1,8%	1,8%
Главный пик	93,2%	90,9%
A1	1,2%	2,9%
A2	0,6%	1,0%

Фиг. 18В



Фиг. 19



Фиг. 20