

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091555 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.21

(51) Int. Cl. *B01D 15/30* (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.18

(54) СИСТЕМА И СПОСОБ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИМЕСЕЙ
ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

(31) 62/610,029; 62/743,632

(32) 2017.12.22; 2018.10.10

(33) US

(86) PCT/US2018/066160

(87) WO 2019/126123 2019.06.27

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

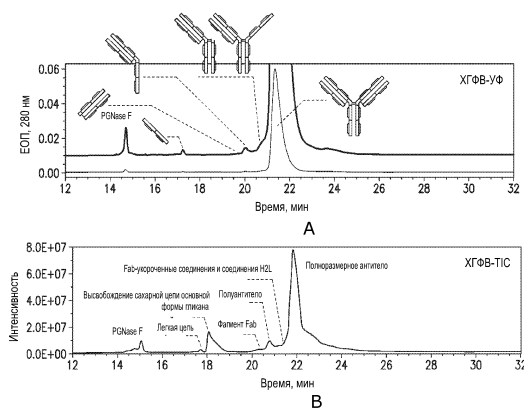
(72) Изобретатель:

Ванг Шунхай (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены системы и способы для определения характеристик низкомолекулярных (НМ) примесей белкового лекарственного препарата. В одном варианте осуществления используется хроматография гидрофильных взаимодействий (ХГФВ) в комбинации с масс-спектрометрическим анализом. После удаления N-связанных гликанов из белкового лекарственного препарата, например лекарственного препарата на основе антител, элюирование НМ примесей из колонки для ХГФВ определяли по величине молекулярной массы соединений. В некоторых вариантах осуществления разделение методом ХГФВ выполняют в денатурирующих условиях, что делает обнаружение НМ форм с использованием этого метода в высокой степени сопоставимым с методами ДСН-ПААГ-электрофореза и СЕ-SDS. НМ примеси лекарственного препарата включают, но не ограничиваются ими, соединения легкой цепи, полуантитела, H2L, H2, HL, HC, соединения с укороченным пептидным остовом и их комбинации.



A1

202091555

202091555

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563031EA/045

СИСТЕМА И СПОСОБ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК ПРИМЕСЕЙ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Изобретение в целом относится к способам разделения белков и способам культивирования клеток.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Моноклональные антитела (мкАт) успешно применяли в широком спектре терапевтических областей в течение последних двух десятилетий (Walsh G., *Nature biotechnology*, 32:992-1000 (2014); Lawrence S. *Nature biotechnology*, 25:380-2 (2007)). Хотя мкАт обладают консервативной ковалентной гетеротетрамерной структурой, состоящей из двух дисульфид-связанных тяжелых цепей, каждая из которых ковалентно связана дисульфидной связью с легкой цепью, эти белки часто содержат низкие уровни примесей, связанных с препаратом, даже после стадий глубокой очистки. Как низкомолекулярные (НМ) соединения (например, фрагменты с укороченным пептидным остовом), так и высокомолекулярные (ВМ) соединения (например, димерные антитела) являются примерами связанных с продуктом примесей, которые способствуют размерной гетерогенности препаратов на основе мкАт. Образование ВМ соединений в терапевтическом лекарственном препарате на основе мкАт в результате агрегации белка может потенциально снизить как эффективность лекарственного средства, так и его безопасность (например, вызывая нежелательный иммуногенный ответ) (Rosenberg AS. *The AAPS journal*, 8:E501-7 (2006); Moussa EM, et al. *Journal of pharmaceutical sciences*, 105:417-30(2006)). НМ соединения любого терапевтического белка могут быть образованы в результате активности протеазы клетки-хозяина во время продуцирования. НМ соединения часто имеют низкую или существенно сниженную активность по сравнению с мономерной формой антитела, в то же время подвергаясь воздействию новых эпитопов, которые могут привести к иммуногенности или потенциально влиять на фармакокинетические свойства *in vivo* (Vlasak J, Ionescu R. *mAbs*, 3:253-63 (2011)). В результате как ВМ, так и НМ соединения считаются критическими показателями качества, которые регулярно контролируют во время разработки лекарственного средства и как часть тестирования высвобождения очищенной фармацевтической субстанции во время производства.

Молекулярно-весовую гетерогенность препаратов на основе мкАт традиционно характеризуют при помощи различных ортогональных аналитических методов (Michels DA, Parker M, Salas-Solano O. *Electrophoresis*, 33:815-26(2012)). Один из наиболее часто используемых методов оценки чистоты препарата на основе мкАт представляет собой ДСН-ПААГ-электрофорез, выполняемый в невосстанавливающих условиях. Во время анализа по отношению к антителам можно регулярно наблюдать и количественно определять минорные полосы, соответствующие НМ соединениям, включая соединения

H2L (2 тяжелые цепи и 1 легкая цепь), H2 (2 тяжелые цепи), HL (1 тяжелая цепь и 1 легкая цепь), HC (1 тяжелая цепь) и LC (1 легкая цепь) (Liu H, Gaza-Bulseco G, Chumsae C, Newby-Kew A. *Biotechnology letters*, 29:1611-22(2007)). Также можно наблюдать протеолитические фрагменты. Предполагаемая идентичность каждой минорной полосы может быть подтверждена при помощи N-концевого секвенирования посредством расщепления по Эдману, триптического гидролиза в геле с последующим масс-спектрометрическим анализом и вестерн-блоттингом с использованием антител против Fc и антител против легкой цепи. Однако любые предложенные структуры, полученные в результате этих методов, не могут быть однозначно подтверждены на уровне интактного белка. Кроме того, условия подготовки образца, используемые в экспериментах с ДНС-ПААГ-электрофорезом, могут генерировать НМ артефакты посредством скремблирования дисульфидной связи, что может привести к завышению оценок в отношении минорных НМ соединений (Zhu ZC, et al. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 83:89-95(2013)). В последнее время капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (CE-SDS) стал современным эквивалентом ДНС-ПААГ-электрофореза, который обеспечивает превосходную воспроизводимость, чувствительность и пропускную способность (Rustandi RR, Washabaugh MW, Wang Y. *Electrophoresis*, 29:3612-20 (2008); Lacher NA, et al. *Journal of separation science*, 33:218-27 (2010); Hunt G, Moorhouse KG, Chen AB. *Journal of chromatography A*, 744:295-301(1996)). Во время анализа методом CE-SDS препаратов на основе мкАт обычно наблюдают минорные пики с более коротким временем выходом пика (НМ формы), чем у интактного антитела. В отличие от анализа методом ДНС-ПААГ-электрофореза, эти НМ примеси не могут быть извлечены или подвергнуты дальнейшему анализу. В результате идентификация НМ примесей, обнаруживаемых методами CE-SDS, часто предлагается исключительно на основе эмпирических знаний. Таким образом, ортогональный метод для прямого разделения и однозначной идентификации НМ примесей в препаратах на основе мкАт необходим для обеспечения контроля над процессом производства во время разработки препарата на основе антител.

Точное измерение массы интактных белков мкАт с помощью современных масс-спектрометров становится все более популярным в биофармацевтической промышленности как один из самых надежных методов идентификации (Kaltashov IA, et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21:323-37 (2010)); Zhang H, Cui W, Gross ML. *FEBS letters*, 588:308-17(2014)). В частности, различные «комбинированные хромато-масс-спектрометрические» методы продемонстрировали способность обнаруживать примеси с низкой концентрацией в препаратах на основе мкАт и обеспечивать высокодетальный анализ, который не может быть достигнут ни методами ДНС-ПААГ-электрофореза, ни CE-SDS (Le JC, Bondarenko PV. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16:307-11 (2005); Habegger M, et al. *mAbs*, 8:331-9 (2016)). Например, обращенно-фазовая хроматография (ОФХ) в комбинации с масс-спектрометрией может быть использована для обнаружения свободных легких цепей и

связанных с ними посттрансляционных модификаций (например, цистеинилирования и глутатионилирования), присутствующих в лекарственных препаратах на основе мкАт. Однако, по сравнению с методами ДСН-ПААГ-электрофореза и СЕ-SDS, ОФХ часто не обладает достаточным разрешением для разделения НМ соединений и, таким образом, не может определить полный НМ профиль. Например, идентификацию Н2L соединений в лекарственных препаратах на основе мкАт никогда не осуществляли с помощью анализа массы исходного вещества на основе ОФХ из-за их низкого содержания и низкого разрешения от основного интактного антитела. Другой метод на основе МС, который является перспективным для определения характеристик примесей, связанных с препаратом на основе мкАт, представляет собой масс-спектрометрию с нативной электрораспылительной ионизацией (нативная ЭРИ-МС (ESI-MS)), которая особенно информативна в комбинации с эксклюзионной хроматографией (ЭХ) (Haberger M, et al. *mAbs*, 8:331-9 (2016)). Тем не менее, НМ соединения, идентифицированные в анализе методом нативной ЭХ/МС, часто не совпадают с теми, которые идентифицированы с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза или СЕ-SDS, из-за существенно отличающихся экспериментальных условий, используемых в этих методах. В частности, подготовка образца, необходимая для ДСН-ПААГ-электрофореза и СЕ-SDS, часто начинается с денатурации белка, когда нековалентные взаимодействия между N-концевыми областями пар HC-LC и C-концевыми областями пар HC-HC разрушаются. В результате НМ примеси, такие как соединения Н2L, полуантитела и свободной легкой цепи, способны диссоциировать от молекулы мкАт, если дисульфидные связи между цепями разрываются. Для сравнения, нативная ЭХ-МС анализирует образцы мкАт в почти неденатурирующих условиях, позволяя сохранять сильные нековалентные межцепочечные взаимодействия и четырехцепочечную структуру молекулы мкАт, даже если межцепочечные дисульфидные связи разрываются. Хотя достижения в химических реакциях в колонках для ЭХ позволили использовать денатурирующие буферы (например, 30% ацетонитрил, 0,1% FA и 0,1% TFA), которые обычно используются в обращенно-фазовой хроматографии для разделения методом ЭХ и прямого соединения с масс-спектрометрическим анализом в режиме онлайн (Liu H, Gaza-Bulseco G, Chumsae C. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20:2258-64(2009)), разрешение LC остается все еще неоптимальным для обнаружения многих НМ соединений.

Таким образом, целью изобретения заключается в том, чтобы обеспечить системы и способы для определения характеристик НМ примесей белковых лекарственных препаратов.

Другая цель изобретения заключается в том, чтобы обеспечить белковые лекарственные препараты со сниженными уровнями примесей.

Еще одна цель изобретения заключается в том, чтобы обеспечить способы получения белковых лекарственных препаратов со сниженными уровнями примесей белкового лекарственного препарата.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены системы и способы для определения характеристик низкомолекулярных (НМ) примесей белкового лекарственного препарата. В одном варианте осуществления используется хроматография гидрофильных взаимодействий (ХГФВ) в комбинации с масс-спектрометрическим анализом. После удаления N-связанных гликанов из белкового лекарственного препарата, например, лекарственного препарата на основе антител, элюирование НМ примесей из колонки для ХГФВ определяют по величине молекулярной массы соединений. В некоторых вариантах осуществления разделение методом ХГФВ выполняют в денатурирующих условиях, что делает обнаружение НМ форм с использованием этого метода в высокой степени сопоставимым с методами ДСН-ПААГ-электрофореза и CE-SDS. НМ примеси лекарственного препарата включают, но не ограничиваются ими, соединения легкой цепи, полуантитела, H2L, H2, HL, HC, соединения с укороченным пептидным остовом, и их комбинации.

Описанные системы и способы ХГФВ-МС обеспечивают подробные данные об идентификации НМ. Надежная идентификация и подробные данные о структуре, выявленные с помощью ХГФВ-МС анализа, очень важны для углубленной характеристики НМ примесей в белковых лекарственных препаратах, что часто требуется для разработки молекулы на поздней стадии. Кроме того, поскольку в описанной системе и способах ХГФВ-МС используются более щадящие условия подготовки образцов, чем в ДСН-ПААГ-электрофорезе или CE-SDS, вероятность возникновения НМ артефактов меньше. Системы и способы ХГФВ-МС можно использовать в качестве полуколичественного анализа для сравнения профилей НМ примесей между образцами или просто для качественной оценки.

Один вариант осуществления обеспечивает белковый лекарственный препарат, содержащий белковое лекарственное средство и наполнитель, при этом белковый лекарственный препарат содержит от около 0,05 до около 30,0% мас./мас. низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства. Белковый лекарственный препарат может представлять собой антитело, гибридный белок, рекомбинантный белок или их комбинацию. В других вариантах осуществления лекарственный препарат содержит от около 0,05% до около 25%, или от около 0,05% до около 15%, или от около 0,05% до около 10%, или от около 0,05% до около 5%, или от около 1 до около 25%, от около 1 до около 15%, от около 1 до около 10% или от около 1 до около 5% мас./мас. низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства.

Другой вариант осуществления обеспечивает способ для определения характеристик низкомолекулярных примесей белкового лекарственного препарата, включающий стадии

дегликозилирования образца белкового лекарственного препарата,

разделения белковых компонентов образца белкового лекарственного препарата при помощи хроматографии гидрофильных взаимодействий, и

анализа разделенных белковых компонентов с помощью масс-спектро스코пии для характеристики низкомолекулярных примесей белкового лекарственного препарата в образце белкового лекарственного препарата.

Способ дополнительно обеспечивает необязательную стадию восстановления. Стадия восстановления может иметь место между стадией i) и стадией ii). Образец белкового лекарственного препарата может быть получен из периодической культуры с подпиткой. Как отмечено выше белковый лекарственный препарат может представлять собой антитело, гибридный белок, рекомбинантный белок или их комбинацию.

Еще один вариант осуществления обеспечивает способ получения антитела, включающий стадии культивирования клеток, продуцирующих антитело в культуре клеток, получения образца из культуры клеток, определения характеристик и количественной оценки низкомолекулярных примесей в образце в соответствии со способом, описанным выше, и модификации одного или более условий культивирования клеток для уменьшения количества охарактеризованных низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства, продуцируемых во время культивирования клеток, для антитела. В некоторых вариантах осуществления образец отбирают во время культивирования клеток с любым интервалом. В других вариантах осуществления образец отбирают после производственного культивирования, после сбора белка или после очистки. Одно или более условий культивирования клеток, которые изменяются для уменьшения количества низкомолекулярных примесей лекарственного белкового средства, могут быть выбраны из группы, состоящей из температуры, pH, плотности клеток, концентрации аминокислот, осмоляльности, концентрации факторов роста, перемешивания, парциального давления газа, поверхностно-активных веществ или их комбинации. Клетки могут быть эукариотическими или прокариотическими. Клетки могут представлять собой клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggic-CHO), клетки COS (например, COS-7), клетки сетчатки, клетки Vero, клетки CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), клетки HeLa, клетки HepG2, клетки WI38, клетки MRC 5, Colo25 клетки, клетки HB 8065, клетки HL-60, лимфоциты, например, аутологичные Т-клетки, Jurkat (Т-лимфоциты) или Daudi (В-лимфоциты), клетки A431 (эпидермальные), клетки U937, клетки 3T3, клетки L, клетки C127, клетки SP2/0, клетки NS-0, клетки MMT, стволовые клетки, опухолевые клетки и линию клеток, полученную из любой из вышеупомянутых клеток. В одном варианте осуществления клетки представляют собой клетки гибридомы или квадromы. Еще один вариант осуществления относится к антителу, полученному при помощи способов, описанных в данном документе.

Еще один вариант осуществления относится к системе для определения характеристик низкомолекулярных примесей лекарственного средства. Система включает систему жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, включающую колонку для жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (ХГФВ), связанную с подвижной фазой А и подвижной фазой В, как показано в данном документе

в качестве примера, и колонку для ХГФВ, сообщенную по текучей среде с системой масс-спектропии.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к применению способа согласно изобретению для определения стабильности и исследований принудительной деградации белкового лекарственного продукта.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к применению системы согласно изобретению для определения стабильности и исследований принудительной деградации белкового лекарственного продукта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1А и 1В представлены хроматограммы для разделения методом ХГФВ образца фармацевтической субстанции на основе мкАт-1. На Фиг. 1А представлен ультрафиолетовый профиль, а на Фиг. 1В - профиль ХГФВ. Для лучшей визуализации НМ примесей на Фиг. 1А УФ-сигнал был усилен в 10 раз.

На Фиг. 2А показаны хроматограммы по выделенному иону (ХИС) различных вариантов легкой цепи с использованием m/z преобладающего зарядового состояния. На Фиг. 2В показан масс-спектр с деконволюцией для легкой цепи с β -элиминированием. На Фиг. 2С показан масс-спектр с деконволюцией для легкой цепи, модифицированной 2-меркаптоуксусной кислотой, немодифицированной легкой цепи и легкой цепи с расщепленными С-концевыми остатками. На Фиг. 2D показан масс-спектр с деконволюцией для легкой цепи с цистеинилированием. На Фиг. 2Е показан масс-спектр с деконволюцией для легкой цепи с глутатионилированием.

На Фиг. 3А показан масс-спектр с деконволюцией для фрагментов Fab. На Фиг. 3В показан масс-спектр с деконволюцией для полуантитела. На Фиг. 3С показан масс-спектр с деконволюцией для Fab-укороченных фрагментов. На Фиг. 3D показан масс-спектр с деконволюцией для H2.

На Фиг. 4 показан анализ на основе ХГФВ-УФ дегликозилированного образца мкАт-1, обработанного ДТТ (стрелка № 1) и L-цистеином (стрелка № 2). Стрелка № 3 указывает на график с необработанным мкАт-1. Сигнал необработанного образца и образца, обработанного L-цистеином, амплифицировали в 10 и 2 раза, соответственно, чтобы лучше визуализировать НМ примеси.

На Фиг. 5А показано соединение легкой цепи, идентифицированное в анализе мкАт-1 методом ХГФВ-МС после обработки ДТТ. На Фиг. 5В показано соединение тяжелой цепи, идентифицированное в анализе мкАт-1 методом ХГФВ-МС после обработки ДТТ. На Фиг. 5С показано соединение полуантитела, идентифицированное в анализе мкАт-1 методом ХГФВ-МС после обработки ДТТ. На Фиг. 5D показано соединение димера тяжелых цепей, идентифицированное в анализе мкАт-1 методом ХГФВ-МС после обработки ДТТ. На Фиг. 5Е показано соединение H2L, идентифицированное в анализе мкАт-1 методом ХГФВ-МС после обработки ДТТ. На Фиг. 5F показано соединение полноразмерного антитела, идентифицированное в анализе мкАт-1 методом ХГФВ-МС после обработки ДТТ.

На Фиг. 6А показан спектр MS2 С-концевых пептидов легкой цепи от расщепления Lys-C в невосстанавливающих условиях, где С-концевой Cys модифицирован йодацетамидом. На Фиг. 6В показан спектр MS2 С-концевых пептидов легкой цепи от расщепления Lys-C в невосстанавливающих условиях, где С-концевой Cys модифицирован неизвестной модификацией +89,98 Да.

На Фиг. 7А показана хроматограмма по выделенному иону (XIC) С-концевого пептида легкой цепи с неизвестной модификацией +89,98 Да невосстановленных продуктов расщепления Lys-C. На Фиг. 7В показана хроматограмма по выделенному иону (XIC) С-концевого пептида легкой цепи с неизвестной модификацией в +89,98 Да в результате восстановления невосстановленных продуктов расщепления Lys-C.

На Фиг. 8 представлена предполагаемая структура (2-меркаптоуксусная кислота) неизвестной модификации.

На Фиг. 9 представлена иллюстративная система ХГФВ-МС.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

Использование терминов в единственном числе и аналогичных ссылок на единственное число в контексте описания заявленного в настоящее время изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее термины и в единственном, и множественном числе, если иное не указано в данном документе или явно не противоречит контексту.

Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для того, чтобы служить кратким способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включается в описание, как если бы оно было отдельно указано в данном документе.

Использование термина «около» предназначено для описания значений выше или ниже указанного значения в диапазоне приibl. +/- 10%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне или выше, или ниже указанного значения в диапазоне приibl. +/- 5%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне или выше, или ниже указанного значения в диапазоне приibl. +/- 2%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне или выше, или ниже указанного значения в диапазоне приibl. +/- 1%. Предполагается, что предыдущие диапазоны будут понятны из контекста, и никаких дополнительных ограничений не предполагается. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Использование любого и всех примеров или иллюстративных формулировок (например, «таких как»), представленных в данном документе, предназначено только для лучшей иллюстрации изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одна формулировка в описании не должна

истолковываться как указывающая на какой-либо не заявленный элемент как существенный для практического осуществления изобретения.

Термин «низкомолекулярная (НМ) примесь белкового лекарственного средства» включает, но не ограничивается ими, предшественники, продукты деградации, укороченные соединения, протеолитические фрагменты, включая фрагменты Fab, фрагменты Fc или тяжелой цепи, фрагменты лиганда или рецептора, соединения H2L (2 тяжелые цепи и 1 легкая цепь), H2 (2 тяжелые цепи), HL (1 тяжелая цепь и 1 легкая цепь), HC (1 тяжелая цепь) и LC (1 легкая цепь). НМ примесь белкового лекарственного средства может представлять собой любой вариант, который является неполной версией белкового препарата, такой как один или более компонентов мультимерного белка. Примесь белкового лекарственного средства, примесь лекарственного средства или примесь препарата представляют собой термины, которые могут использоваться взаимозаменяемо во всем описании, и включают НМ примеси белкового лекарственного средства. НМ примеси лекарственного средства или препарата обычно рассматривают как молекулярные варианты со свойствами, такими как активность, эффективность и безопасность, которые могут отличаться от свойств желаемого лекарственного продукта.

Деградация белкового препарата представляет собой проблему во время производства белкового лекарственного препарата в системах культур клеток. Например, протеолиз белкового препарата может происходить вследствие высвобождения протеаз в среде для культивирования клеток. Добавки к питательной среде, такие как растворимые источники железа, добавляемые для ингибирования металлопротеаз, или ингибиторы сериновых и цистеиновых протеаз, были внесены в культуру клеток для предотвращения деградации (Clincke, M.-F., et al, BMC Proc. 2011, 5, P115). С-концевые фрагменты могут быть отщеплены во время производства из-за карбоксилпептидаз в культуре клеток (Dick, LW et al, Biotechnol Bioeng 2008; 100:1132-43). Соответственно возникает необходимость в профилировании и мониторинге НМ примесей.

«Белок» относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, соединенных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды и может также включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липида, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксилирование и АДФ-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая лекарственные средства на основе белков, и белки включают, помимо прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или гибридные белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных методов культивирования клеток и, как правило, вводятся в клетку методами генной инженерии (например, такими как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, последовательность без интронов и т. д.), где последовательности могут находиться в виде эписомы или могут быть интегрированными в геном клетки.

«Антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно поделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такими как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с несколькими отличающимися эпитопами. Биспецифические антитела в целом описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527, которая включена в данную заявку посредством ссылки.

«Fc-слитые белки» содержат часть или все из двух или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые иначе не встречаются вместе в природе. Получение гибридных белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, гибридные с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая домен Fc), было 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, стр. 10.19.1-10.19.11, 1992. «Слитые белки рецептор-Fc» включают один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с фрагментом Fc, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которым следуют домены CH2- и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок содержит две или более различных рецепторных цепей, которые связываются с одним или более лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка ИЛ-1 или ловушка ФРЭС.

«Культура клеток» относится к размножению или пролиферации клеток в сосуде, таком как колба или биореактор, и включает, но не ограничивается ими, периодическую культуру с подпиткой, непрерывную культуру, проточную культуру и тому подобное.

Термин «ХГФВ» относится к жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий или хроматографии гидрофильных взаимодействий и считается общеизвестным термином в данной области техники.

Представляющие интерес белки

Любой представляющий интерес белок, подходящий для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках, может быть использован в предложенных системах сконструированных клеток-хозяев. Например, представляющий интерес белок включает, но не ограничивается этим, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-слитый белок или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент, или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент. Представляющие интерес белки могут представлять собой простые полипептиды, состоящие из одной субъединицы, или сложные мультисубъединичные белки, содержащие две или более субъединиц. Представляющий интерес белок может представлять собой биофармацевтический препарат, пищевую добавку или консервант или любой белковый препарат, подлежащий очистке и стандартизации качества.

В некоторых вариантах осуществления белковый препарат (представляющий интерес белок) представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, антигенсвязывающий фрагмент антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетратело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')₂, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из антитела против белка программируемой клеточной гибели 1 (например, антитела против PD1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203579A1), антитела против лиганда 1 белка программируемой клеточной гибели (например, антитела против PD-L1, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0203580A1), антитела против Dll4, антитела против ангиопоэтина-2 (например, антитела против ANG2, как описано в патенте США № 9402898), антитела против ангиопоэтин-подобного белка 3 (например, антитела против AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела против рецептора фактора роста тромбоцитов (например, антитела против PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела против Erb3, антитела против рецептора

пролактина (например, антитела против PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела против компонента 5 комплемента (например, антитела против C5, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0313194A1), антитела против ФНО, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, антитела против РЭФР, как описано в патенте США № 9132192 или антителе против EGFRvIII, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0259423A1), антитела против пропротеинконвертазы 9-го субтилизин-кексинового типа (например, антитела против PCSK9, как описано в патенте США № 8062640 или в публикации заявки на патент США № US2014/0044730A1), антитела против фактора роста и дифференцировки-8 (например, антитела против GDF8, также известного как антитело против миостатина, как описано в патентах США №№ 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагона (например, антитела против GCGR, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), антитела против РЭФР, антитела против ИЛ-1R, антитела против рецептора интерлейкина-4 (например, антитела против ИЛ-4R, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271681A1 или в патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела против рецептора интерлейкина-6 (например, антитела против ИЛ-6R, как описано в патентах США №№ 7582298, 8043617 или 9173880), антитела против ИЛ-1, антитела против ИЛ-2, антитела против ИЛ-3, антитела против ИЛ-4, антитела против ИЛ-5, антитела против ИЛ-6, антитела против ИЛ-7, антитела против интерлейкина-33 (например, антитела против ИЛ-33, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2014/0271658A1 или US2014/0271642A1), антитело против респираторно-синцитиального вируса (например, антитела против РСВ, как описано в публикации заявки на патент США № US2014/0271653A1), антитела против кластера дифференцировки-3 (например, антитела против CD3, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1, в заявке на патент США № 62/222605), антитела против кластера дифференцировки-20 (например, антитела против CD20, как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1, и в патенте США №. 7879984), антитела против CD19, антитела против CD28, антитела против кластера дифференцировки-48 (например, антитела против CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела против Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антитела против коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (например, антитела против БВРС, как описано в публикации заявки на патент США № US2015/0337029A1), антитела против вируса Эбола (как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0215040), антитела против вируса Зика, антитела против гена активации лимфоцитов-3 (например, антитела против LAG3, или антитела против CD223), антитела против фактора роста нервов (например, антитела против NGF, как описано в публикации заявки на патент США № US2016/0017029 и в патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела против активина А. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела против CD3 и

CD20 (как описано в публикациях заявок на патенты США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела против CD3 и муцина-16 (например, биспецифического антитела против CD3 и Muc16), и биспецифического антитела против CD3 и простат-специфического мембранного антигена (например, биспецифического антитела против CD3 и PSMA). В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-atto, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белиумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлтоксумаба, блинатумумаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба пегола, цемиплимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh, эмтанзина алирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гуселькумаб, ибритумумаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-abda, инфликсимаба-dyub, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нецитумумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, ранибизумаба, раксibaкумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба, и ведолизумаба.

В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит фрагмент Fc-и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой гибридный белок рецептор-Fc, который содержит один или более из внеклеточных доменов рецептора, соединенных с фрагментом Fc. В некоторых вариантах осуществления фрагмент Fc, содержит шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления гибридный белок рецептор-Fc содержит две или более различных рецепторных цепей, которые связываются или с одним или с несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок-ловушку (TRAP), такой как, например, ловушку ИЛ-1 (например, рилоноцепт, который содержит область, связывающую лиганд ИЛ-1RACР, слитую с внеклеточной областью ИЛ-1R1, слитой с Fc из hIgG1; см. патент США № 6927004, который включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте), или ловушку ФРЭС (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который содержит Ig-подобный домен-2 рецептора ФРЭС Flt1, слитого с Ig-подобным доменом 3 рецептора ФРЭС Flk1, слитого с Fc из hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или более из одного или более антигенсвязывающих доменов, таких как переменный фрагмент тяжелой цепи и переменный фрагмент легкой цепи, из антитела, соединенного с фрагментом Fc.

Культура клеток

При производстве белка «периодическая культура клеток с подпиткой» или «периодическая культура с подпиткой» относится к периодической культуре, в которой клетки и культуральную среду добавляют в культуральный сосуд на начальном этапе, а культуру дискретно подпитывают дополнительными питательными веществами для культуры в процессе культивирования с или без периодического сбора клеток и/или продуктов до прекращения культивирования. Периодическая культура с подпиткой включает «полунепрерывную периодическую культуру с подпиткой», в которой периодически цельную культуру (которая может включать клетки и среду) удаляют и заменяют свежей средой. Периодическая культура с подпиткой отличается от простой «периодической культуры», в то время как все компоненты для культивирования клеток (включая клетки животных и все питательные вещества для культуры) добавляют в культуральный сосуд в начале процесса культивирования в периодической культуре. Периодическая культура с подпиткой может отличаться от «проточной культуры», поскольку супернатант не удаляют из культурального сосуда во время стандартного периодического процесса с подпиткой, тогда как при проточном культивировании клетки удерживаются в культуре, например, путем фильтрации, и культуральную среду непрерывно или периодически вносят и извлекают из культурального сосуда. Однако предполагается отбор образцов для целей тестирования во время периодического культивирования клеток с подпиткой. Периодический процесс с подпиткой продолжают до тех пор, пока не будет установлено, что достигнут максимальный рабочий объем и/или выработка белка, а затем белок собирают.

Выражение «непрерывная культура клеток» относится к методике, используемой для непрерывного роста клеток, обычно в определенной фазе роста. Например, если требуется постоянное снабжение клеток или требуется получение конкретного представляющего интерес белка, то для культуры клеток может быть необходимо поддержание определенной фазы роста. Таким образом, условия должны постоянно контролироваться и корректироваться соответствующим образом, чтобы поддерживать клетки в этой конкретной фазе.

Термины «среда для культивирования клеток» и «культуральная среда» относятся к питательному раствору, используемому для выращивания клеток млекопитающих, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как источник энергии в виде углеводов, незаменимые (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и заменимые (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин), микроэлементы, источники энергии, липиды, витамины и т.д. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например, сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые обеспечивают исходные материалы, которые поддерживают рост клеток. Среда может содержать экстракты дрожжей или сои вместо экстрактов животного происхождения. Среда с химически определенным составом относится к среде для культивирования

клеток, в которой известны все химические компоненты (т.е. имеют известную химическую структуру). Среда с химически определенным составом полностью не содержит компонентов животного происхождения, такие как пептоны, полученные из сыворотки или животного. В одном варианте осуществления среда представляет собой среду с химически определенным составом.

Раствор также может содержать компоненты, которые увеличивают рост и/или выживаемость выше минимальной нормы, включая гормоны и факторы роста. Раствор может быть составлен с рН и концентрацией соли, оптимальными для выживаемости и пролиферации конкретной культивируемой клетки.

«Линия клеток» относится к клетке или клеткам, которые получены из определенной линии посредством серийного пассирования или субкультивирования клеток. Термин «клетки» используется взаимозаменяемо с «популяцией клеток».

Термин «клетка» включает любую клетку, которая подходит для экспрессии последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот, такие как бактериальные клетки, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки животных, отличных от человека, клетки птиц, клетки насекомых, клетки дрожжей или клеточные гибриды, такие как, например, гибридомы или квадромы. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления клетка выбрана из следующих клеток: клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, например, Jurkat (Т-лимфоцита) или Daudi (В-лимфоцита), A431 (эпидермальной), U937, 3T3, клетки L, клетки C127, SP2/0, NS-0, клетки ММТ, стволовой клетки, опухолевой клетки, и линии клеток, полученной из любой из вышеупомянутых клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов, например, клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетки PER.C6®). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO K1.

II. СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПИСАНИЯ ХАРАКТЕРИСТИК НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРИМЕСЕЙ БЕЛКОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Мультисубъединичные терапевтические белки, в частности терапевтические средства на основе моноклональных антител (мкАт), по своей природе неоднородны по размеру из-за их сложной многоцепочечной структуры и склонности к множественным ферментативным и химическим посттрансляционным модификациям. Хотя уровни связанных с размерами вариантов в лекарственном препарате на основе мкАт можно легко определить количественно различными биофизическими методами, однозначная идентификация этих связанных с препаратом примесей была особенно сложной.

Хроматографию гидрофильных взаимодействий (ХГФВ) в комбинации с масс-спектрометрическим анализом использовали для выявления низких уровней примесей с более низкой молекулярной массой (НМ), присутствующих в партии очищенной фармацевтической субстанции. После удаления N-связанных гликанов метод ХГФВ разделяет связанные с мкАт НМ примеси в порядке элюирования по размеру. Последующее измерение массы с помощью точного масс-спектрометра с высоким разрешением обеспечивает прямую и однозначную идентификацию множества НМ примесей, содержащихся в низкой концентрации, в одном анализе методом ЖХ-МС. Соединения свободной легкой цепи, полуантитела, H2L (антитело, обладающее одной легкой цепью) и соединение с укороченным пептидным остовом, можно уверенно идентифицировать и объяснить с большой детализацией, включая сайты укорочения и связанные с ними посттрансляционные модификации. Такая подробная информация, которая не может быть получена с помощью традиционных анализов чистоты (например, ДСН-ПААГ-электрофорез и CE-SDS), имеет большое значение для выяснения того, как образуются НМ примеси, что делает этот новый метод ценным дополнением к перечню аналитических методов определения характеристик. Это первый известный отчет, в котором соединение H2L были непосредственно обнаружено в образце фармацевтической субстанции на основе мкАт с помощью анализа массы исходного вещества без предварительного обогащения.

А. Системы для определения характеристик НМ примесей

Система включает систему жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, включающую колонку для жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (ХГФВ), связанную с подвижной фазой А и подвижной фазой В и колонку для ХГФВ, сообщенную по текучей среде с системой для масс-спектропии. Колонка для ХГФВ подходит для применения с дегликозилированными белками. В одном варианте осуществления описанная система содержит гликопротеин амидную колонку Waters ACQUITY™ UPLC (300 Å, 1,7 мкм, 2,1×150 мм) с системой Waters ACQUITY™ UPLC. Колонка, как правило, работает при 60 °С. Иллюстративные подвижные фазы включают 0,1% TFA в воде в качестве подвижной фазы А, 0,1% TFA в ацетонитриле в качестве подвижной фазы В, и скорость потока устанавливали на 0,2 мл/мин. Показания УФ, как правило, регистрируют при 215 и 280 нм. В одном варианте осуществления разделение достигается в течение 55 минут с начальным удерживанием в течение 0,5 минут при 15% А, за которым следует увеличение до 25% А в течение следующих 0,5 минут и дополнительное линейное увеличение до 40% А в течение следующих 40 минут. Градиент может быть линейно увеличен до 100% А в течение 1 минуты и может удерживаться в течение 2 минут, а затем снижаться до 15% А в течение 1 минуты, а затем поддерживаться в исходных условиях в течение более 10 минут для уравнивания колонки для следующего цикла.

УЭЖХ напрямую соединена с масс-спектрометром, например, гибридным квадрупольным масс-спектрометром Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole

Orbitrap. Капиллярное напряжение, как правило, устанавливают на уровне 4,0 кВ, при этом скорость потока защитного газа составляет 40 условных единиц, а скорость потока вспомогательного газа - 15 условных единиц. Температуру капилляра, как правило, устанавливают на уровне 350 °С, а температуру нагревателя, как правило, обычно устанавливают на уровне 400 °С. Масс-спектры получают в диапазоне масс m/z 800-4000. В одном варианте осуществления необработанные данные подвергают деконволюции с использованием программного обеспечения Intact Mass™, разработанного Protein Metrics.

В. Способы определения характеристик НМ примесей

Описанные системы и способы могут быть использованы для определения характеристик НМ примесей белкового лекарственного средства. Один вариант осуществления относится к способу для определения характеристик низкомолекулярных примесей белкового лекарственного препарата, включающий стадии дегликозилирования образца белкового лекарственного препарата, разделения белковых компонентов образца белкового лекарственного препарата при помощи хроматографии гидрофильных взаимодействий и анализа выделенных белковых компонентов при помощи масс-спектропии для определения характеристик низкомолекулярных примесей белкового лекарственного препарата в образце белкового лекарственного препарата. В одном варианте осуществления образец белкового лекарственного препарата отбирают или очищают из периодической культуры клеток с подпиткой, непрерывной культуры клеток или проточной культуры клеток. Иллюстративный белковый лекарственный препарат включает, но не ограничивается ими, антитело, гибридный белок, рекомбинантный белок или их комбинацию. Иллюстративные низкомолекулярные примеси белкового лекарственного препарата включают, но не ограничиваются ими, предшественники, продукты деградации, укороченные соединения, протеолитические фрагменты, включая фрагменты Fab, фрагменты лиганда или рецептора, или фрагменты тяжелых цепей, свободную легкую цепь, полуантитело, H2L, H2, HL, HC или их комбинацию.

Другой вариант осуществления включает стадию восстановления образца. Иллюстративные восстанавливающие агенты включают, но не ограничиваются ими, дитиотреитол (DTT, CAS 3483-12-3), бета-меркаптоэтанол (BME, 2BME, 2-ME, b-mer, CAS 60-24-2), 2-аминоэтантол (2-MEA-HCl, также называемый цистеамин-HCl, CAS 156-57-0), трис-(2-карбоксиэтил)фосфин гидрохлорид (TCEP, CAS 5961-85-3), гидрохлорид цистеина (Cys-HCl, CAS 52-89 -1) или натриевую соль 2-меркаптоэтансульфоновой кислоты (MESNA). В данной области техники известны другие способы восстановления белковых связей, такие как колонка с иммобилизованным восстанавливающим агентом, которая содержит смолу, в которую был иммобилизован восстанавливающий агент на основе тиола для обеспечения твердофазного восстановления пептидных и белковых дисульфидных связей. Также предусмотрены восстанавливающие агенты, включая окисляющие агенты, которые подходят для уменьшения химического взаимодействия между полипептидами.

Иллюстративные профили элюирования обсуждались выше.

С. Способы получения белковых лекарственных препаратов высокой чистоты

Один вариант осуществления относится к способу получения антитела, включающий стадии культивирования клеток, продуцирующих антитело, например, в периодической культуре с подпиткой, получения образца из культуры клеток, описания характеристик и количественной оценки низкомолекулярных примесей в образце с использованием систем и способов, описанных в данном документе, и модификации одного или более условий культивирования клеток для уменьшения количества охарактеризованных низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства, продуцируемых во время культивирования клеток, для антитела. Как правило, условия изменяют, чтобы добиться содержания примесей белкового лекарственного средства в диапазоне от 0,05% до 30,0%, предпочтительно от 0,05% до 15%, от 0,05% до 10%, от 0,05% до 5% или от 0,05% до 2% (мас./мас.).

Одно или более условий культивирования клеток, которые изменяются для уменьшения количества низкомолекулярных примесей лекарственного белкового средства, выбраны из группы, состоящей из температуры, pH, плотности клеток, концентрации аминокислот, осмоляльности, концентрации факторов роста, перемешивания, парциального давления газа, поверхностно-активных веществ или их комбинации.

В одном варианте осуществления клетки, продуцирующие антитело, представляют собой клетки яичника китайского хомячка. В других вариантах осуществления клетки представляют собой клетки гибридомы.

В другом варианте осуществления антитело, полученное в соответствии со способами, предложенными в данном документе, содержит от 1 до 5%, от 5 до 10%, от 10 до 15%, от 15 до 20% примесей белкового лекарственного средства.

Примеры

Пример 1. Разделение образца фармацевтической субстанции на основе мкАт-1 методом ХГФВ

Материалы

Для данного исследования использовали рекомбинантное мкАт IgG1 (мкАт-1), произведенное компанией Regeneron. Пептид-N-глюкозидаза F (PNGase F, № P0704L) была приобретена у New England Biolabs, 1 М раствор трис-гидрохлорида, pH 7,5 (№ 15567-027) был приобретен у Invitrogen, дитиотреитол (DTT, № 20291) был приобретен у Thermo Fisher Scientific и L-цистеин (№ 168149-25G) был приобретен у Sigma-Aldrich. Ацетонитрил (степень чистоты для ЖХ-МС, № A955-4) и трифторуксусная кислота (TFA, № P128904) были приобретены у Fisher Scientific. Вода Milli-Q была получена самостоятельно.

Способы

Дегликозилирование мкАт-1 и ограниченное восстановление при помощи DTT и L-цистеина

Образец мкАт-1 разбавляли до конечной концентрации 5 мкг/мкл, используя 100 мМ Трис-НСl (рН 7,5). PNGase F добавляли при соотношении фермента к субстрату 1 единица/10 мкг белка. Реакцию дегликозилирования проводили при 37 °С в течение 3 часов. Для инициации ограниченного восстановления при помощи DTT, навеску в 20 мкг дегликозилированного образца мкАт-1 восстанавливали с помощью 5 мМ DTT перед немедленной инъекцией в колонку ХГФВ для УФ и масс-спектрометрического анализа в режиме онлайн. Для инициации ограниченного восстановления при помощи L-цистеина, навеску в 20 мкг дегликозилированного образца мкАт-1 восстанавливали 5 мМ L-цистеином и затем при 37 °С в течение 30 минут перед инъекцией в колонку ХГФВ для УФ и масс-спектрометрического анализа в режиме онлайн.

Анализ методом ХГФВ-УФ и ХГФВ-МС

Гликопротеин амидную колонку Waters ACQUITY UPLC (300 Å, 1,7 мкм, 2,1×150 мм) использовали в системе Waters ACQUITY UPLC для всех разделений методом ХГФВ. Колонка работала при 60 °С. Подвижные фазы представляли собой 0,1% TFA в воде в качестве подвижной фазы А, 0,1% TFA в ацетонитриле в качестве подвижной фазы В, и скорость потока устанавливали на 0,2 мл/мин. Показания УФ регистрировали при 215 и 280 нм. Разделение достигали в течение 55 минут с начальным удерживанием в течение 0,5 минут при 15% А, за которым следовало увеличение до 25% А в течение следующих 0,5 минут и дополнительное линейное увеличение до 40% А в течение следующих 40 минут. Затем градиент линейно увеличивали до 100% А в течение 1 минуты и удерживали в течение 2 минут, а затем снижали до 15% А в течение 1 минуты, а затем поддерживали в исходных условиях в течение более 10 минут для уравнивания колонки для следующего цикла. УЭЖХ была напрямую соединена с гибридным квадрупольным масс-спектрометром Thermo Scientific Q Exactive Hybrid Quadrupole Orbitrap. Капиллярное напряжение устанавливали на уровне 4,0 кВ, при этом скорость потока защитного газа составляла 40 условных единиц, а скорость потока вспомогательного газа - 15 условных единиц. Температуру капилляра устанавливали на уровне 350 °С, а температуру нагревателя, как правило, обычно устанавливали на уровне 400 °С. Масс-спектры получали в диапазоне масс m/z 800-4000. Необработанные данные подвергали деконволюции с использованием программного обеспечения Intact Mass™, разработанного Protein Metrics.

Результаты

Образец фармацевтической субстанции на основе рекомбинантного мкАт IgG1 (мкАт-1) использовали в качестве модельной молекулы. После обработки PNGase F для удаления N-связанных гликанов на каждой тяжелой цепи образец дегликозилированного мкАт-1 отделяли на колонке ХГФВ и анализировали с помощью детектирования фотодиодной матрицей (PDA) (как при 280 нм, так и при 215 нм) и масс-спектрометрического анализа (Фиг. 1А и 1В). Как показано на УФ-профиле (Фиг. А1, нижний график), общий уровень НМ примесей в образце фармацевтической субстанции на основе мкАт-1 был очень низким, что свидетельствует об успешном процессе очистки.

Путем сравнения хроматограммы общего ионного тока (TIC), полученной в результате масс-спектрометрического анализа, с УФ-хроматограммой, на графике TIC наблюдали дополнительный пик (со временем удерживания $\sim 18,2$ мин), который соответствовал основной форме гликана (G0F), высвобожденной из мкАт-1 при помощи PNGase F. Поскольку олигосахариды не проявляют УФ-поглощения ни при 280 нм, ни при 215 нм, они невидимы при УФ-детектировании. В дополнение к пику реагента PNGase F все остальные минорные пики были идентифицированы как связанные с мкАт-1 НМ примеси, в частности, соединения свободной легкой цепи (с множеством модификаций), фрагментов Fab, полуантитела, Fab-укороченные соединения и H2L (Фиг. 1А и 1В). Порядок элюирования этих НМ примесей на колонке ХГФВ коррелировал с их относительным размером, причем более мелкие фрагменты элюировались раньше, чем более крупные фрагменты. Важно отметить, что удаление N-связанных гликанов из молекулы мкАт является необходимым до этого анализа. В противном случае элюирование по размеру в определенном порядке в колонке для ХГФВ будет осложнено наличием или отсутствием гликанов и различных гликоформ.

Пример 2. Свободная легкая цепь

Результаты

Много примесей, связанных с легкой цепью, было обнаружено в ХГФВ-МС анализе образца мкАт-1 (Фиг. 2А-2Е). Хроматограммы по выделенному иону (XIC) каждого соединения позволяют предположить, что они также демонстрируют различное время удерживания во время разделения методом ХГФВ (Фиг. 2А). Интересно, что цистеинилированная легкая цепь (+ ~ 119 Да) была идентифицирована как основная форма всех соединений легких цепей, присутствующих в образце мкАт-1, и это единственное соединение, наблюдаемое при помощи УФ-излучения (Фиг. 2D). Цистеинилирование может происходить в результате реакции тиол-дисульфидного обмена между дисульфидной связью, связывающей тяжелые и легкие цепи, и молекулой свободного цистеина, которая может быть обнаружена в цитоплазме. Кроме того, была идентифицирована глутатионилированная легкая цепь (+ ~ 306 Да) с временем удерживания, немного более продолжительным, чем для цистеинилированной легкой цепи (Фиг. 2Е). Подобно процессу цистеинилирования, за эту модификацию должна отвечать молекула свободного глутатиона (GSH), которая также может быть обнаружена в цитоплазме. Был также обнаружен другой интересный вариант LC с разницей масс ~ 90 Да от прогнозируемой массы (Фиг. 2С). Последующий анализ картирования пептидов с использованием рекомбинантной протеазы Lys-C обнаружил эту модификацию в С-концевом остатке Cys легкой цепи. Основываясь на точной разнице масс (+89,98 Да) и изотопном распределении, предположили, что эта модификация была результатом реакции тиол-дисульфидного обмена между дисульфидной связью, связывающей тяжелую и легкую цепи, и молекулой 2-меркаптоуксусной кислоты. Однако в настоящее время изучается вопрос о том, как это соединение появилось или как было образовано в процессе получения мкАт. Несмотря на то, что невидимые на графике УФ

немодифицированная свободная легкая цепь также может быть обнаружена с помощью более чувствительного масс-спектрометрического анализа вместе с группой вариантов легких цепей, соответствующих последовательному отсечению С-концевых аминокислотных остатков (Фиг. 2С). Полученный аминокислотный маркер, как показано на масс-спектре с деконволюцией (Фиг. 2С), сопоставлен с С-концевой последовательностью легкой цепи (Gly-Glu-Cys). Удаление С-концевых аминокислотных остатков из легкой цепи может быть объяснено присутствием некоторых карбоксилпептидаз в культуре клеток (Dick LW, Jr., Qiu D, Mahon D, Adamo M, Cheng KC. *Biotechnology and bioengineering*, 100:1132-43 (2008); Hu Z, et al. *Biotechnology and bioengineering*, 113:2100-6 (2016). Наконец, также был идентифицирован другой вариант легкой цепи с уменьшением массы на ~ 34 Да (Фиг. 2В), что предполагает возможное превращение цистеина в дегидроаланин посредством β -элиминирования С-концевого остатка Cys легкой цепи. Эта реакция была хорошо изучена ранее и идентифицирована как основной путь для последующего укорочения в шарнирной области антитела во время хранения (Cohen SL, Price C, Vlasak J. *Journal of the American Chemical Society*, 129:6976-7(2007)). Следует отметить, что все эти связанные с легкой цепью примеси вряд ли будут обнаружены методом ЭХ в неденатурирующих условиях, поскольку они все еще могут связываться с тяжелой цепью посредством сильного нековалентного взаимодействия, несмотря на разрыв дисульфидной связи между тяжелой и легкой цепями.

Пример 3. Фрагмент Fab

Результаты

Хорошо известно, что верхняя шарнирная область тяжелых цепей в молекуле IgG1 подвержена гидролизу, приводящему к образованию двух комплементарных НМ соединений, фрагмента Fab и Fab-укороченного соединения (Cordoba AJ, Shyong BJ, Breen D, Harris RJ. *Journal of chromatography B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 818:115-21 (2005). При помощи метода ХГФВ-МС обнаружили оба соединения в образце мкАт-1. Были идентифицированы четыре основных фрагмента Fab с различными массами (Фиг. 3А-3D), и сайты укорочения были найдены путем сравнения измеренных масс с прогнозируемыми массами на основе аминокислотной последовательности, полученной из кДНК. Аминокислотная последовательность, указанная в масс-спектре с деконволюцией, соответствует последовательности шарнирной области тяжелой цепи (Cys-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Cys). Стоит отметить, что любой фрагмент Fab должен быть легко удален во время процесса очистки из-за отсутствия сайта связывания с белком А. Следовательно, присутствие фрагментов Fab в конечном лекарственном препарате указывало на то, что эти примеси появлялись в качестве продуктов деградации во время хранения образца. Успешное обнаружение этих соединений подчеркивает, что метод ХГФВ-МС будет полезен в исследованиях стабильности и принудительной деградации во время разработки лекарственных средств на основе мкАт.

Пример 4. Полуантитело

Результаты

Полуантитело образуется в результате скремблирования дисульфидных связей между тяжелыми цепями в шарнирной области в дисульфидные связи внутри тяжелой цепи. В неденатурирующих условиях четырехцепочечная структура молекулы мкАт остается неразрушенной в результате этого скремблирования, вследствие сильного нековалентного взаимодействия между двумя С-концевыми областями тяжелой цепи. Однако при использовании метода с денатурирующими условиями, такого как ДСН-ПААГ-электрофорез или CE-SDS, две молекулы полуантител будут диссоциировать друг от друга и появляться в виде НМ примесей. Во время анализа препарата на основе мкАт-1 методом ХГФВ-МС была достоверно идентифицирована молекула полуантитела (Фиг. 3В). Хорошее совпадение между измеренной массой (73099,5 Да) и прогнозируемой массой (73100,1 Да) позволяет предположить, что, в отличие от сильно модифицированной свободной легкой цепи, существенная модификация не была связана с образованием полуантител, что согласуется с путем скремблирования дисульфидной связи.

Пример 5. Fab-укороченные соединения

Результаты

В качестве комплементарных фрагментов к фрагментам Fab после укорочения шарнирной области тяжелой цепи, Fab-укороченные соединения были также идентифицированы в образце мкАт-1 методом ХГФВ-МС (Фиг. 3С). На колонке для ХГФВ эти соединения элюировались прямо перед основным пиком в виде частично разрешенного плеча пика. Последующее измерение массы подтвердило идентичность Fab-укороченных соединений, и сайты укорочения были расположены в шарнирной области в соответствии с теми, которые наблюдались в фрагментах Fab. Несмотря на низкое разрешение при разделении по сравнению с электрофоретическими методами, метод ХГФВ-МС имеет преимущество в высокой точности и специфичности при точном измерении массы, что делает возможной однозначную идентификацию. В отличие от фрагментов Fab, Fab-укороченные соединения очень трудно удалить из основных соединений во время очистки из-за сохраняющейся Fc-области, которая связывается с белком А. Молекулы моноклональных антител, лишённые Fab-плеча, как ожидается, будут демонстрировать ослабленную активность, поскольку один из двух целевых сайтов связывания отсутствует. Для молекул биспецифических мкАт потеря одного Fab-плеча является вредной для активности лекарственного средства, поскольку оба Fab-плеча необходимы для достижения запланированных терапевтических функций. Поэтому способность обнаруживать и идентифицировать эти соединения непосредственно в образце фармацевтической субстанции очень важна, поскольку это экономит не только время и ресурсы, но и позволяет избежать появления возможных артефактов в процессе обогащения.

Пример 6. Соединения H2L

Результаты

Соединения H2L, состоящие из двух тяжелых цепей и одной легкой цепи, согласно методам ДСН-ПААГ-электрофореза и CE-SDS часто рассматривают как наиболее распространенные НМ примеси, но их присутствие обычно подтверждается только по косвенным и недостаточным данным. Например, N-концевое секвенирование минорной полосы, содержащей H2L, на ДСН-ПААГ может выявить первые несколько аминокислотных остатков как тяжелой цепи, так и легкой цепи, а соотношение интенсивности сигнала между тяжелой цепью и легкой цепью может указывать на соотношение 2 к 1. Ферментативный гидролиз в геле минорной полосы, содержащей H2L, с последующим пептидным картированием на основе ЖХ-МС может достоверно подтвердить наличие как тяжелой, так и легкой цепи. Однако трудно установить точное соотношение между тяжелой цепью и легкой цепью. Оба метода обеспечивают частичную идентификацию соединений H2L, но ни один не может выявить полную структуру. В отличие от этого, метод ХГФВ-МС обеспечивает прямую идентификацию соединений H2L на уровне интактного белка. В препарате на основе мкАт-1 было обнаружено, что гомогенное соединение H2L совместно элюируется с Fab-укороченными соединениями немного впереди интактного антитела. Обнаруженная масса (122851,0 Да) соединения H2L была приблизительно на 34 Да меньше, чем прогнозируемая молекулярная масса молекулы H2L (122884,5 Да). Основной причиной образования соединений H2L в образце мкАт-1 было β -элиминирование остатка цистеина тяжелой цепи, предположительно того, который первоначально образовывал дисульфидную связь между тяжелой и легкой цепью. Такой уровень достоверности и подробная информация не могут быть достигнуты с помощью других хорошо зарекомендовавших себя анализов чистоты, что делает этот метод очень ценным для обеспечения существенной идентификации этих НМ примесей. Считается, что это исследование является первым случаем, когда соединение H2L, как было показано, непосредственно обнаруживают с помощью анализа массы исходного вещества в образце фармацевтической субстанции на основе мкАт без предварительного обогащения (Фиг. 3D).

Пример 7. НМ примеси, образующиеся в условиях принудительной деградации путем ограниченного восстановления

Результаты

По сравнению с анализом образца мкАт-1 методом ХГФВ-МС, методы ДСН-ПААГ-электрофорез и CE-SDS часто выявляют больше НМ примесей, включая димер тяжелых цепей и свободную тяжелую цепь. Для того чтобы продемонстрировать способность нового метода ХГФВ в обнаружении этих примесей, дегликозилированный образец мкАт-1 дополнительно обрабатывали восстановителем (дитиотреитолом (DTT) и L-цистеином) в неденатурирующих условиях для облегчения образования различных НМ примесей. Сообщалось, что в неденатурирующих условиях только межцепочечные дисульфидные связи в молекуле мкАт могут быть восстановлены с помощью DTT, поскольку они являются единственными доступными для растворителя дисульфидными связями в молекуле (Liu H, et al. Analytical chemistry, 82:5219-26 (2010)). После

кратковременного воздействия на молекулу мкАт-1 DTT или L-цистеина могут быть получены НМ примеси с различными комбинациями тяжелых цепей и легких цепей, включая соединения свободной легкой цепи, свободной тяжелой цепи, полуантитела, димера тяжелой цепи и H2L. Как показано на Фиг. 4, эти прогнозируемые НМ соединения были обнаружены во время разделения методом ХГФВ в порядке элюирования, соответствующем их относительному размеру. В дополнение к тем, которые наблюдали в необработанном образце мкАт-1, было обнаружено, что еще два НМ соединения, в частности, соединение свободной тяжелой цепи и соединение димера тяжелых цепей, элюируются между свободной легкой цепью и полуантителом, и немного позже полуантитела (частично разрешенный пик), соответственно.

В дополнение к расположению согласно порядку элюирования, последующий масс-спектрометрический анализ после разделения методом ХГФВ дополнительно подтвердил идентичность каждой примеси на основании точной массы (Фиг. 5А-5F). Интересно, что соединение легкой цепи в образце мкАт-1, обработанном DTT, демонстрировало совершенно иное время удерживания, чем соединение легкой цепи, наблюдаемое в необработанном образце (Фиг. 4). На основании точного измерения массы разница во времени удерживания было объяснено цистеинилированием легкой цепи, которое присутствовало в необработанном образце, но отсутствовало в образце, обработанном DTT. Соответственно, когда мкАт-1 обрабатывали L-цистеином, небольшую фракцию соединения легкой цепи наблюдали в то же время удерживания, что и для соединения легкой цепи в необработанном образце, что свидетельствует о наличии цистеинилированной легкой цепи в образце, обработанном L-цистеином. Наконец, измеренная масса соединения H2L в образце, обработанном DTT (122884,5 Да), совпадает с прогнозируемой массой немодифицированного соединения H2L (122884,5 Да), поскольку образец преимущественно состоит из соединения H2L, образующегося в результате восстановления дисульфидной связи (прогнозируемая масса: 122884,5 Да), и низких уровней ранее существовавшего соединения H2L, образующегося в результате β -элиминирования (прогнозируемая масса: 122850,4 Да)

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

Все публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Все ссылки, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки во всей их полноте. Данное изобретение может быть осуществлено в других конкретных формах без отклонения от сущности или его существенных атрибутов, и, соответственно,

следует сделать ссылку на прилагаемую формулу изобретения, а не на предшествующее описание, как указание объема изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белковый лекарственный препарат, содержащий:

белковое лекарственное средство и наполнитель, причем белковый лекарственный препарат содержит от 0,05% до 30,0% (мас./мас.) низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства.

2. Белковый лекарственный препарат по п. 1, отличающийся тем, что белковый лекарственный препарат выбран из группы, состоящей из антитела, гибридного белка, рекомбинантного белка или их комбинации.

3. Белковый лекарственный препарат по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что низкомолекулярные примеси белкового лекарственного препарата выбраны из группы, состоящей из продуктов деградации, свободной легкой цепи, полуантитела, H2L, H2, HL, HC или их комбинации.

4. Белковый лекарственный препарат по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что лекарственный препарат содержит от 0,05% до 25% мас./мас. низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства.

5. Белковый лекарственный препарат по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что лекарственный препарат содержит от 0,05% до 15% мас./мас. низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства.

6. Белковый лекарственный препарат по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что лекарственный препарат содержит от 0,05% до 10% мас./мас. низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства.

7. Белковый лекарственный препарат по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что лекарственный препарат содержит от 0,05% до 5% мас./мас. низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства.

8. Способ для определения характеристик низкомолекулярных примесей белкового лекарственного препарата, включающий:

- i) дегликозилирование образца белкового лекарственного препарата;
- ii) разделение белковых компонентов образца белкового лекарственного препарата при помощи хроматографии гидрофильных взаимодействий;
- iii) анализ разделенных белковых компонентов при помощи масс-спектропии для определения характеристик низкомолекулярных примесей белкового лекарственного препарата в образце белкового лекарственного препарата, причем белковый лекарственный препарат является таким, как определено в любом из пп. 1-7.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что образец белкового лекарственного продукта получают из культуры с подпиткой.

10. Способ по п. 8 или п. 9, отличающийся тем, что белковый лекарственный препарат выбран из группы, состоящей из антитела, гибридного белка, рекомбинантного белка или их комбинации.

11. Способ по любому из пп. 8-10, отличающийся тем, что низкомолекулярную примесь белкового лекарственного препарата характеризуют как низкомолекулярную

примесь белкового лекарственного препарата, выбранную из группы, состоящую из свободной легкой цепи, полуантитела, H2L, H2, HL, HC или их комбинации.

12. Способ получения антитела, включающий:

- i) культивирование клеток, продуцирующих антитело в культуре клеток;
- ii) получение образца из культуры клеток;
- iii) определение характеристик и количественную оценку низкомолекулярных примесей в образце в соответствии со способом по любому из пп. 8-11, и
- iv) модификацию одного или более условий культивирования культуры клеток для уменьшения количества охарактеризованных низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства, продуцируемых во время культивирования клеток для антитела.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что одно или более условий культивирования клеток, которые изменяют для уменьшения количества низкомолекулярных примесей лекарственного белкового средства, выбраны из группы, состоящей из pH, плотности клеток, концентрации аминокислот, осмоляльности, концентрации факторов роста, перемешивания, парциального давления газа, поверхностно-активных веществ или их комбинации.

14. Способ по п. 12 или п. 13, отличающийся тем, что клетки выбраны из группы состоящей из бактериальных клеток, клеток дрожжей, клеток яичника китайского хомячка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), клеток COS (например, COS-7), клеток сетчатки, клеток Vero, клеток CV1, клеток почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), клеток HeLa, клеток HepG2, клеток WI38, клеток MRC 5, клеток Colo25, клеток HB 8065, клеток HL-60, лимфоцитов, например, аутологичных Т-клеток, Jurkat (Т-лимфоцитов) или Daudi (В-лимфоцитов), клеток A431 (эпидермальных), клеток U937, клеток 3T3, клеток L, клеток C127, клеток SP2/0, клеток NS-0, клеток MMT, стволовых клеток, опухолевых клеток и линии клеток, полученной из любой из вышеупомянутых клеток.

15. Способ по любому из пп. 12-14, отличающийся тем, что клетки представляют собой клетки гибридомы или клетки квадromы.

16. Антитело, полученное при помощи способа по любому из пп. 12-15.

17. Антитело по п. 16, содержащее 0,05 и 30,0% (мас./мас.) низкомолекулярных примесей белкового лекарственного средства.

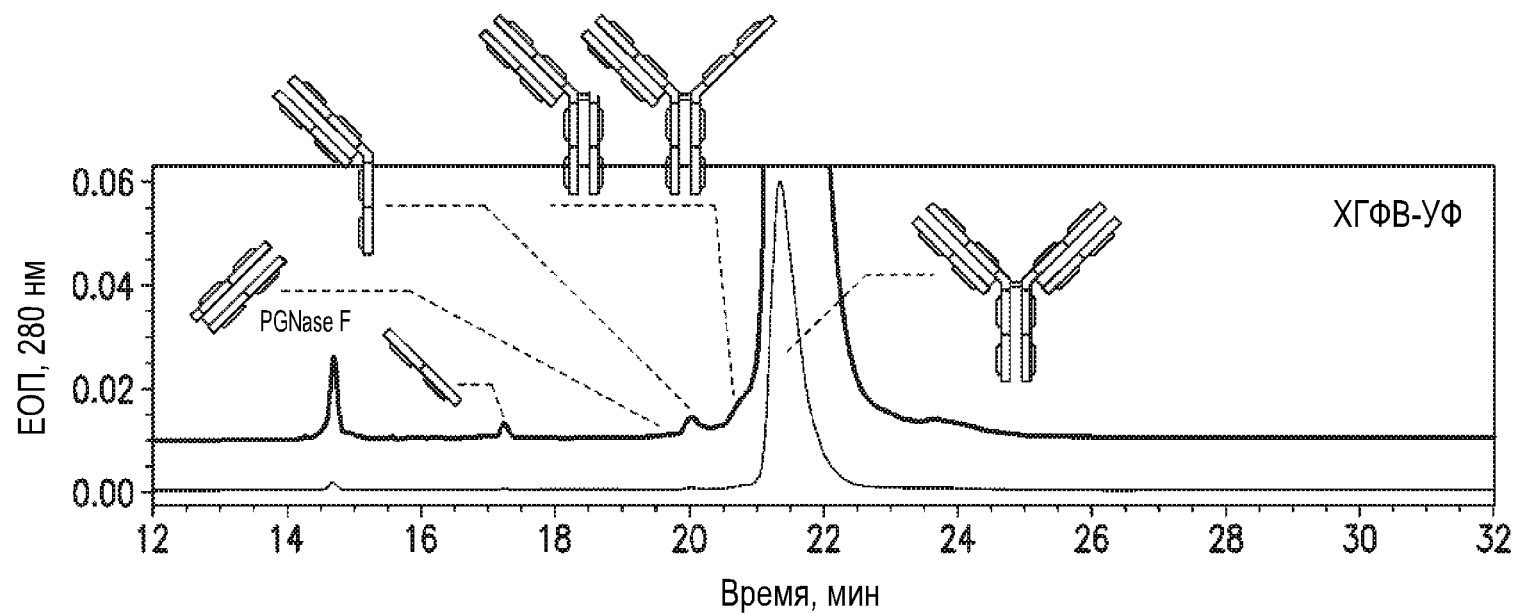
18. Система для определения характеристик низкомолекулярных примесей лекарственного средства, содержащая:

систему жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий, содержащую колонку для жидкостной хроматографии гидрофильных взаимодействий (ХГФВ), соединенную с по меньшей мере двумя колонками с подвижной фазой, причем колонка для ХГФВ сообщается по текучей среде с системой для масс-спектропии.

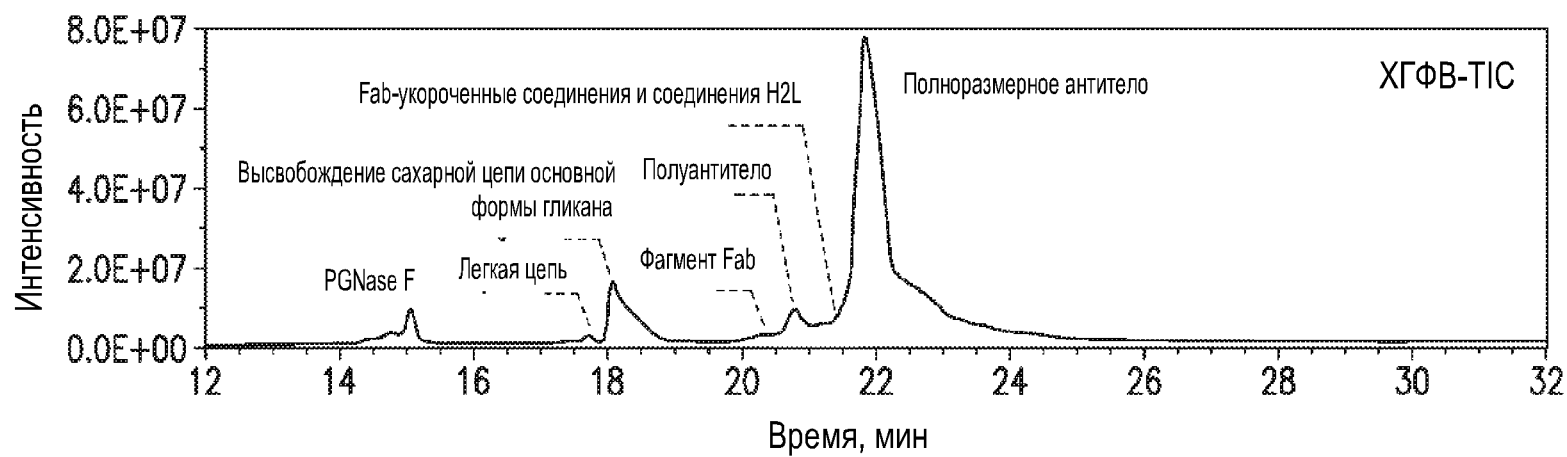
19. Применение способа по любому из пп. 8-11 для определения стабильности и исследований принудительной деградации белкового лекарственного препарата.

20. Применение системы по п. 18 для определения стабильности и исследований принудительной деградации белкового лекарственного продукта.

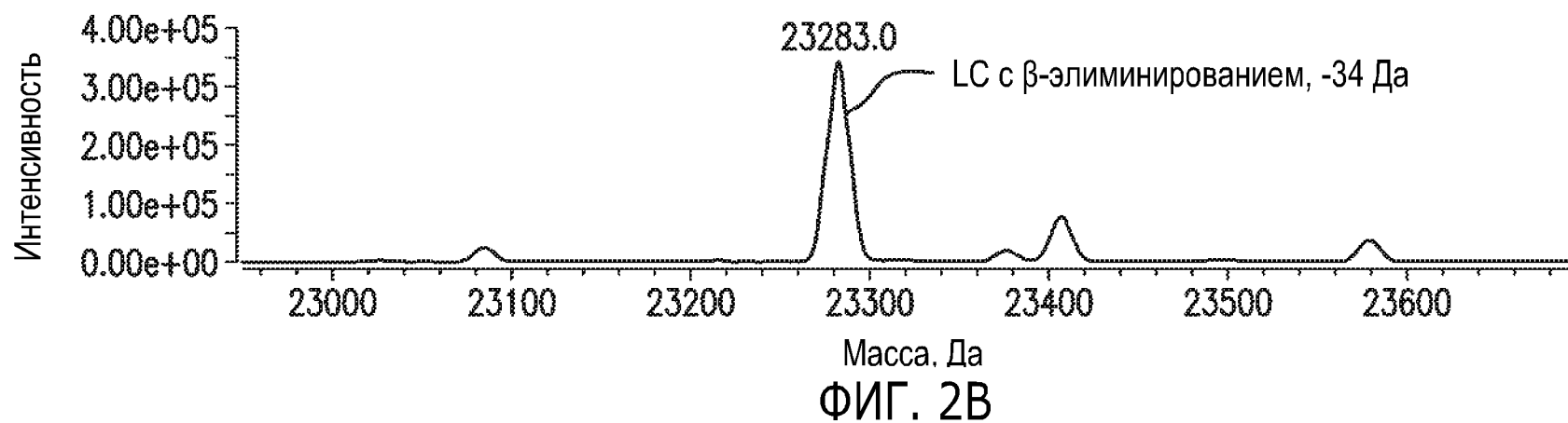
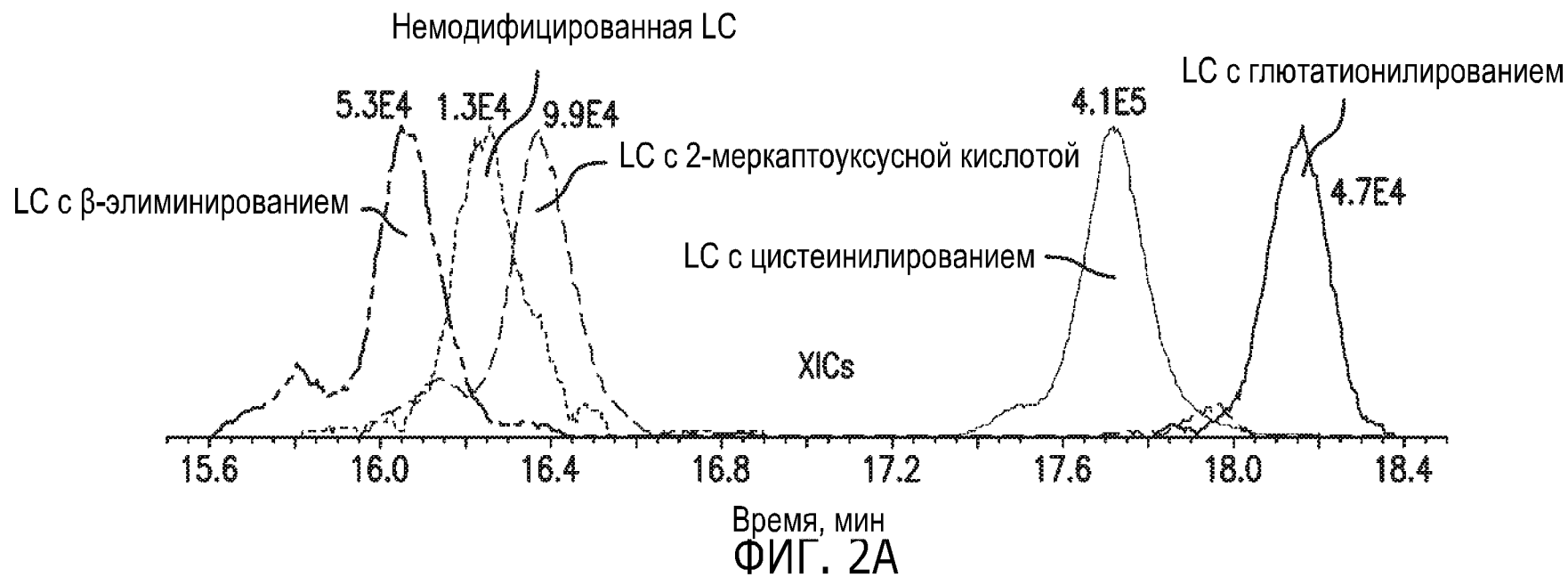
По доверенности

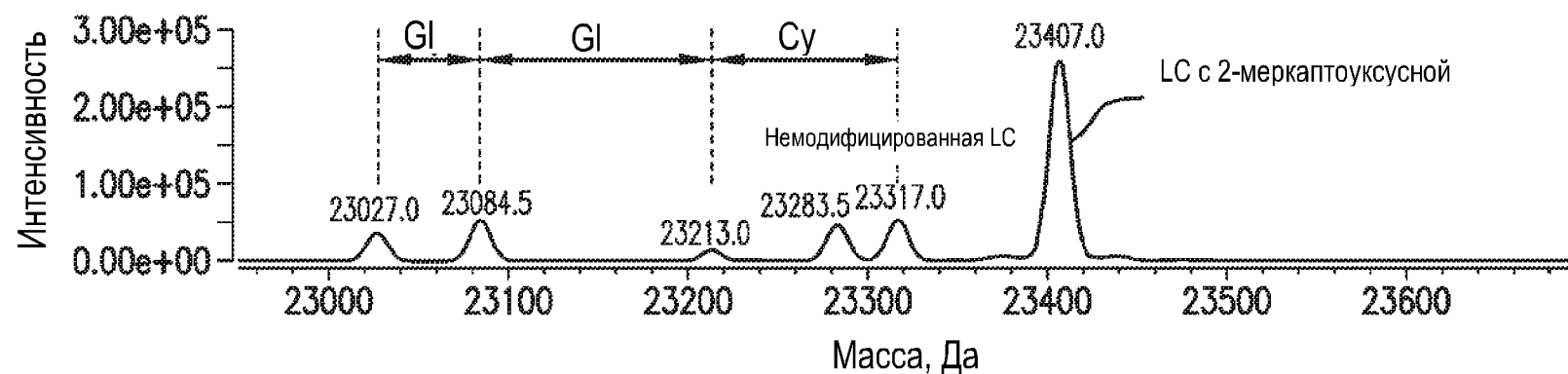


ФИГ. 1А

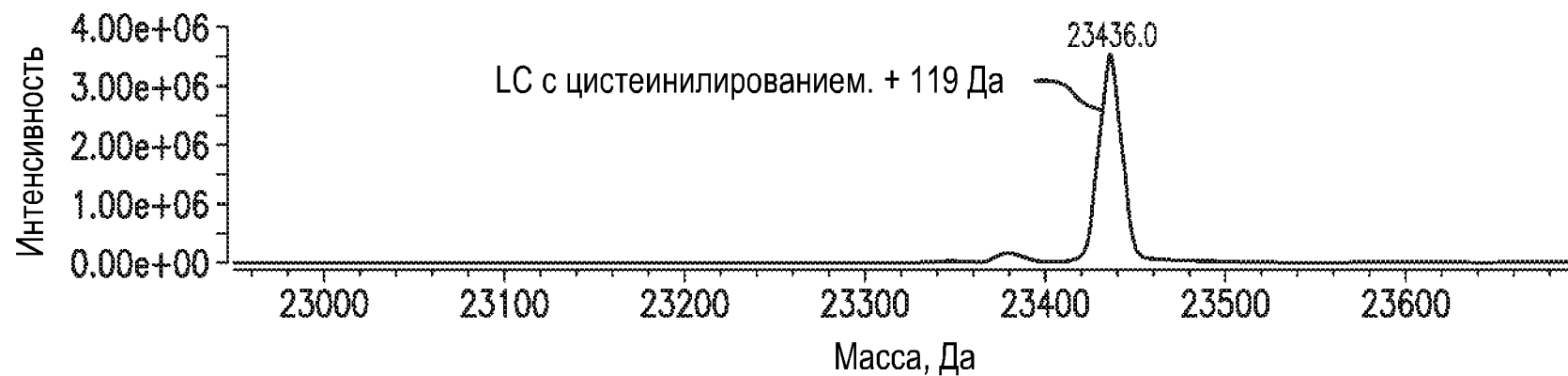


ФИГ. 1В

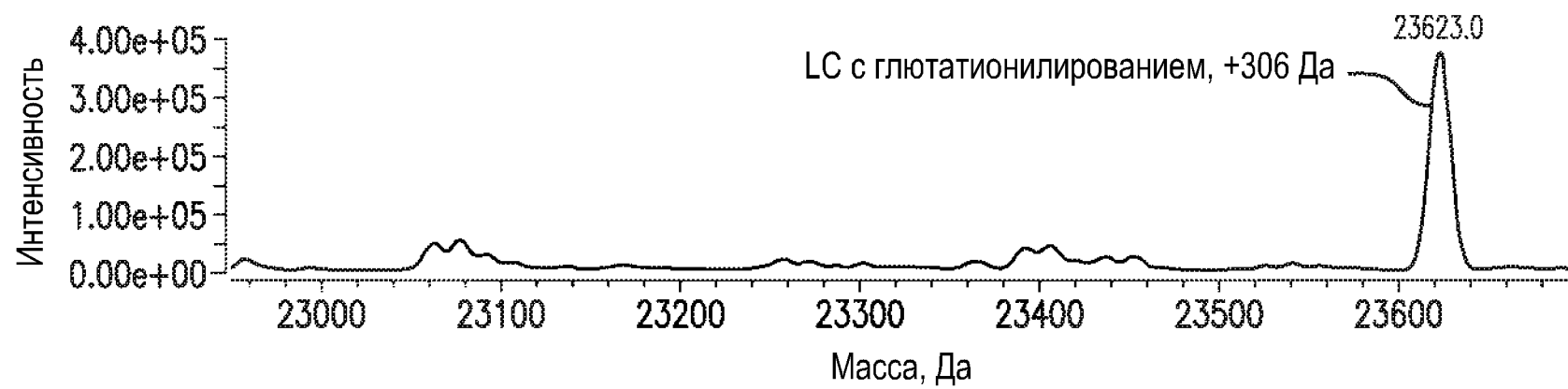




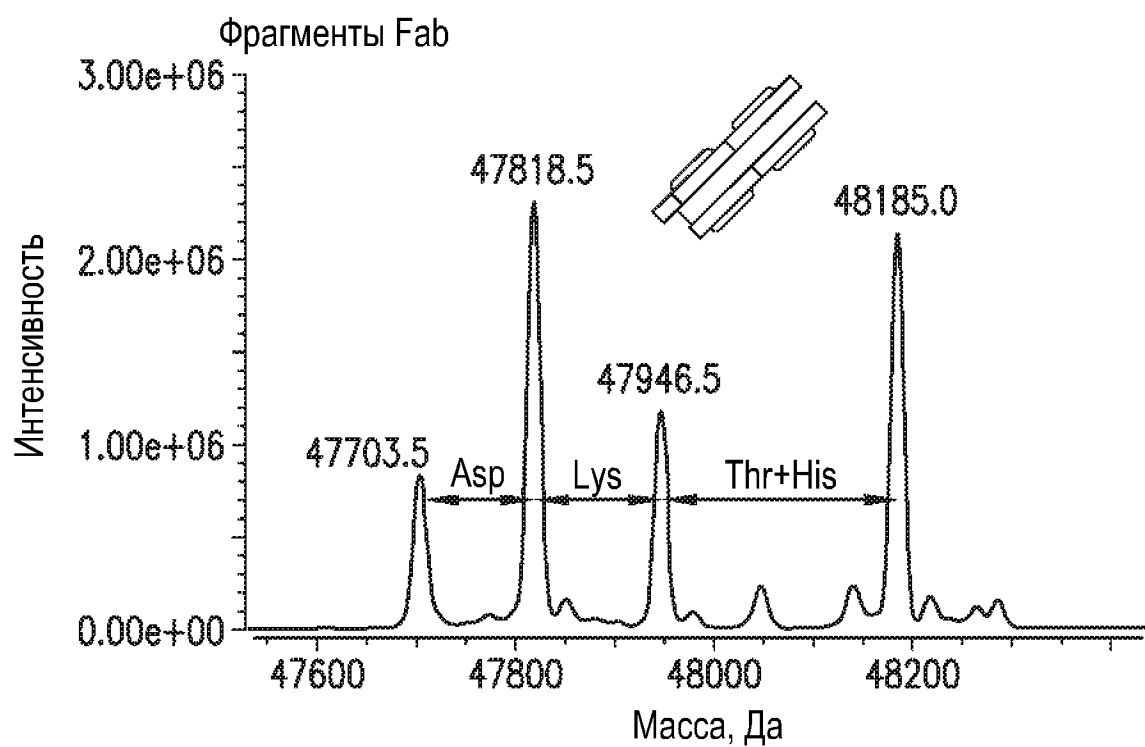
ФИГ. 2С



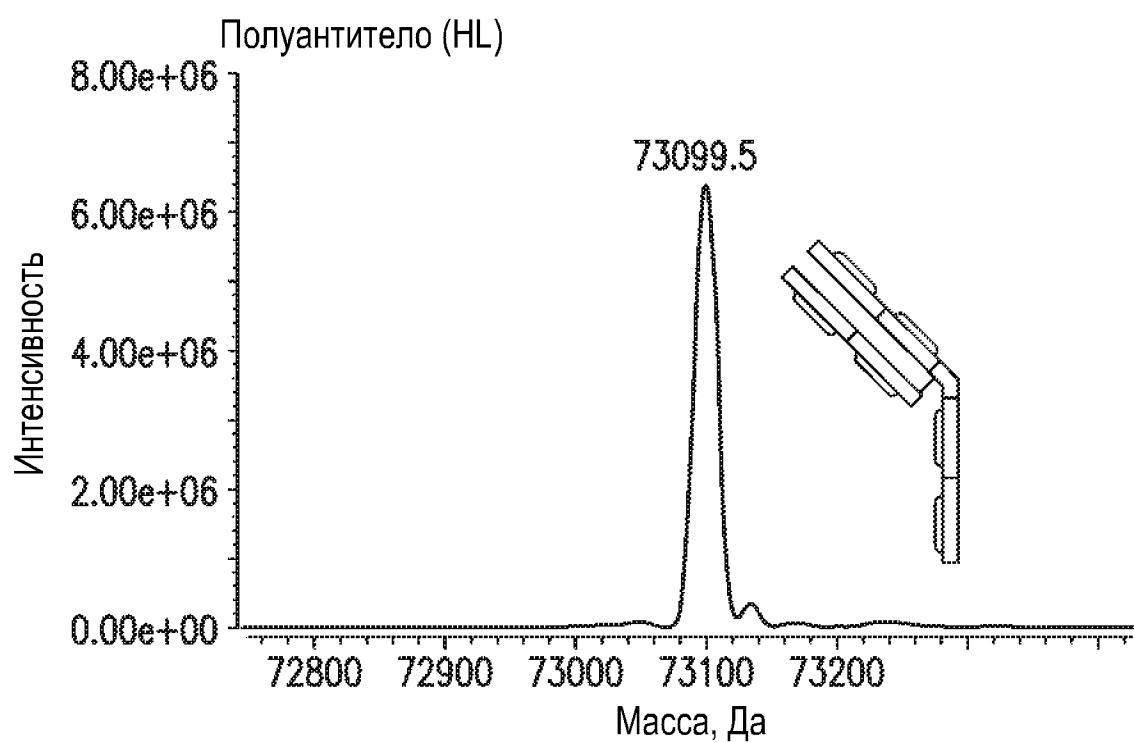
ФИГ. 2D



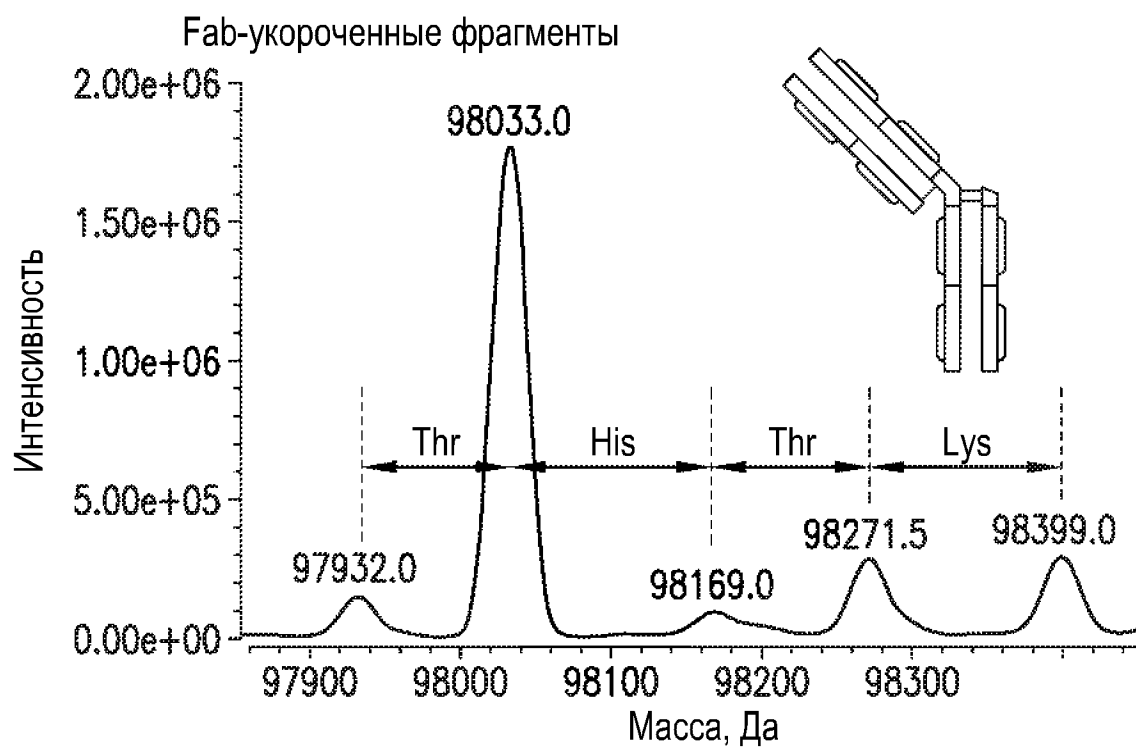
ФИГ. 2Е



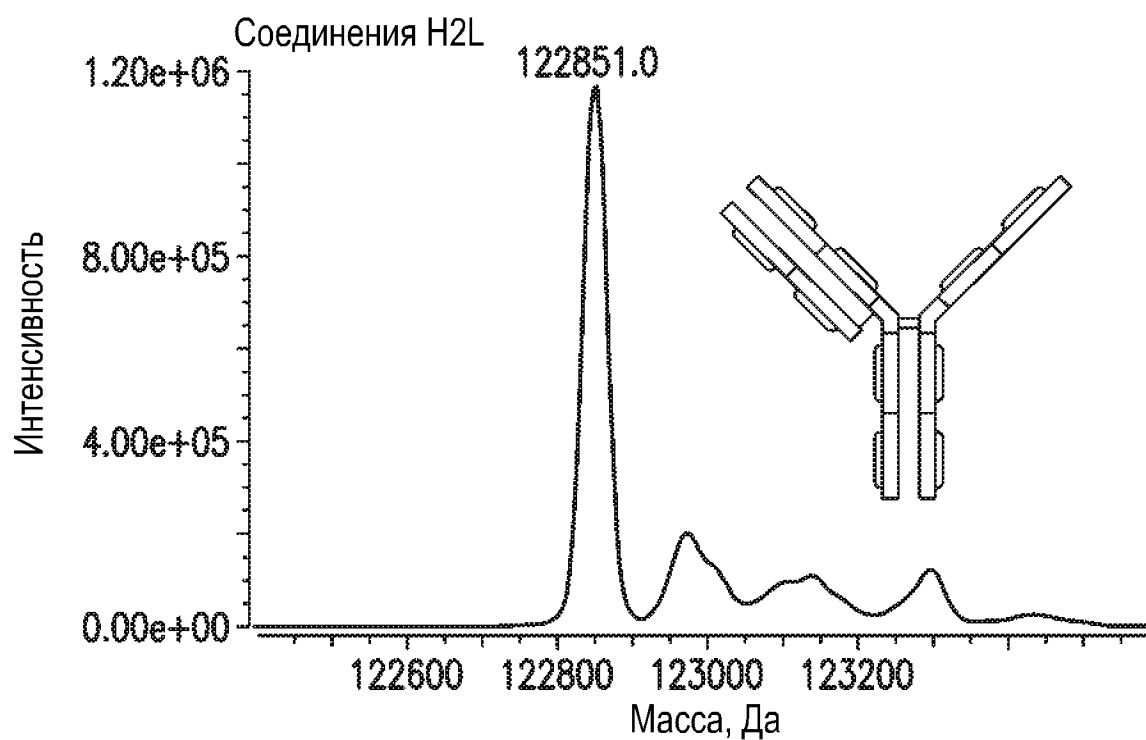
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



ФИГ. 3С

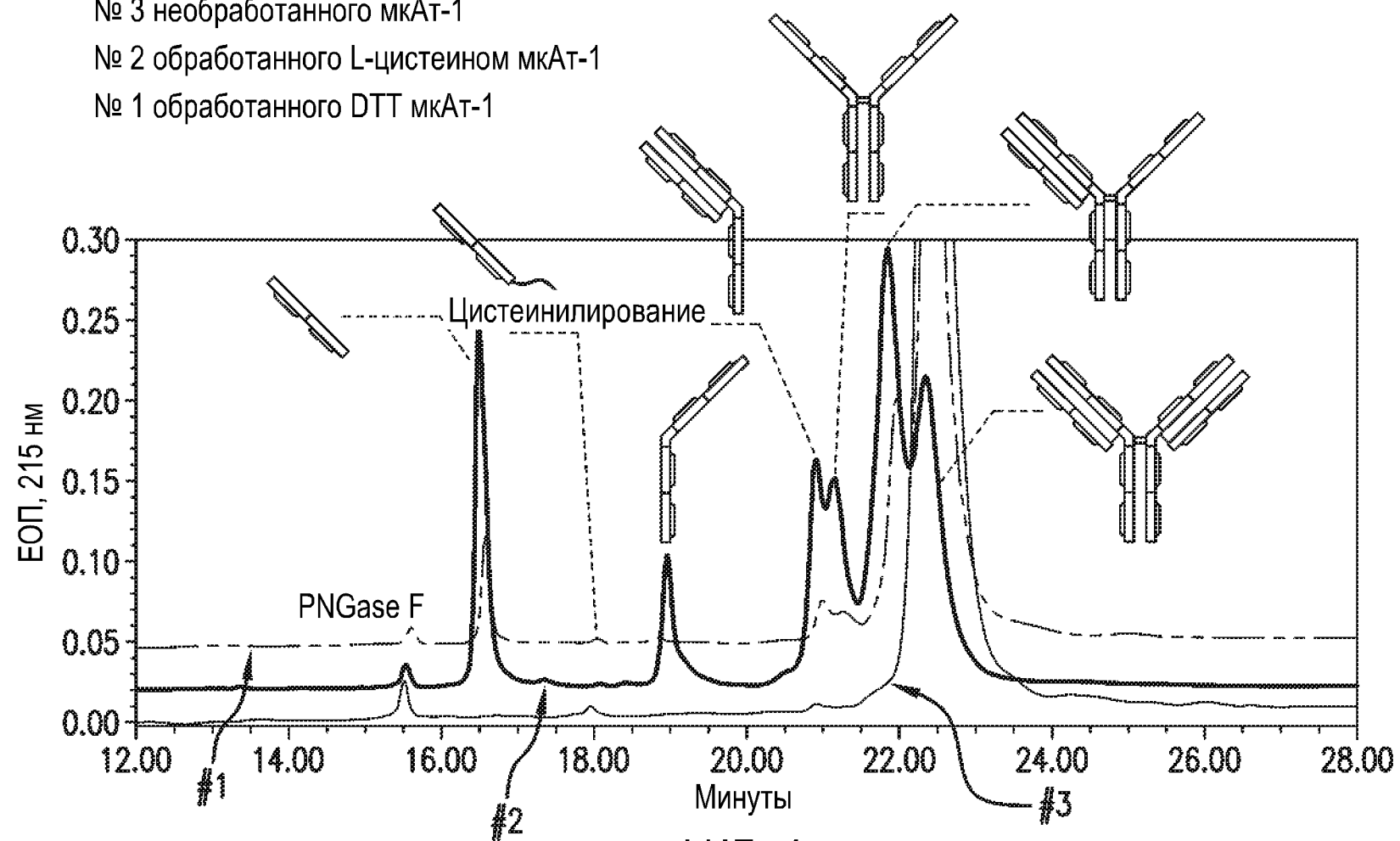


ФИГ. 3D

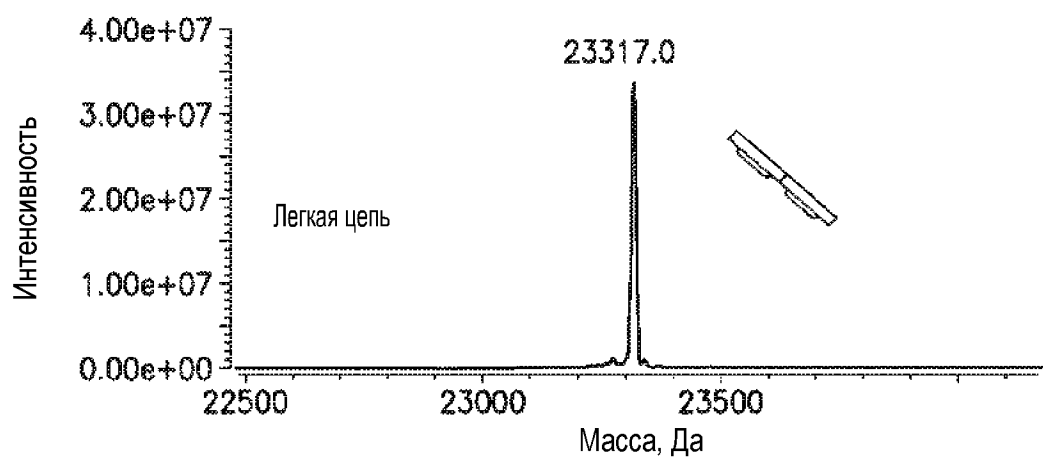
№ 3 необработанного мкАт-1

№ 2 обработанного L-цистеином мкАт-1

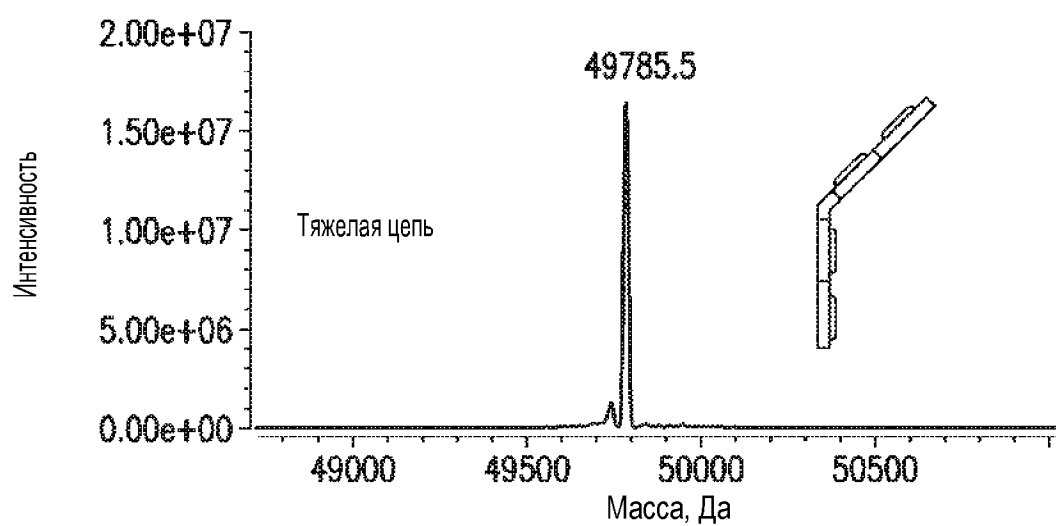
№ 1 обработанного DTT мкАт-1



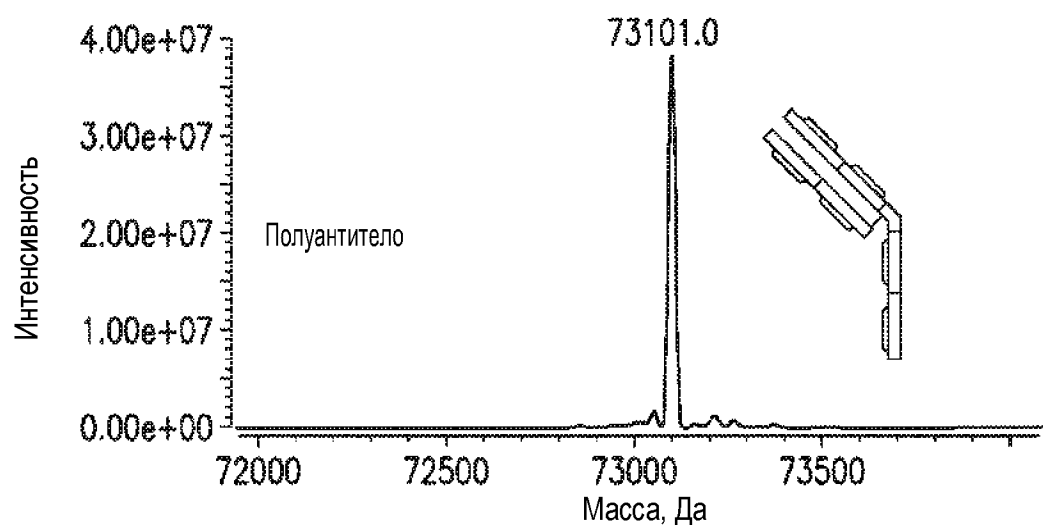
ФИГ. 4



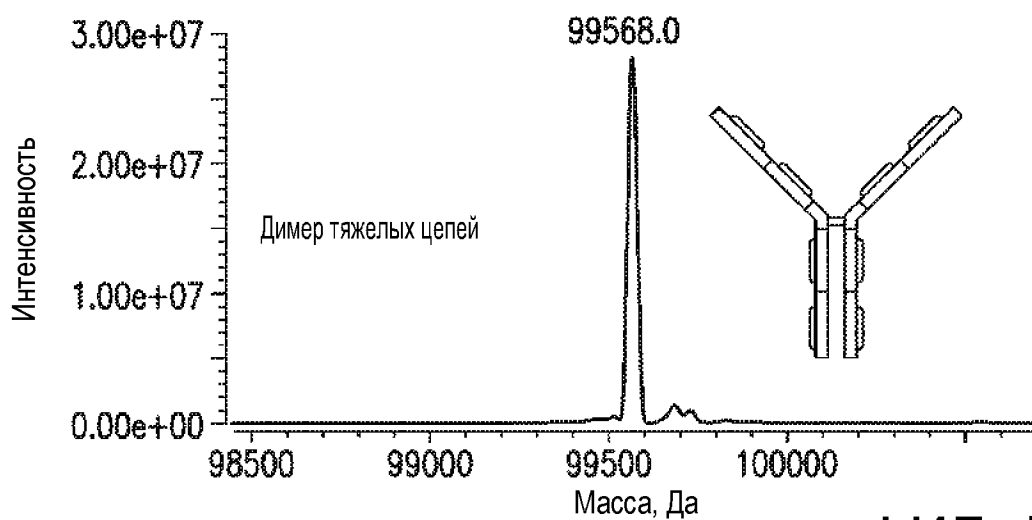
ФИГ. 5А



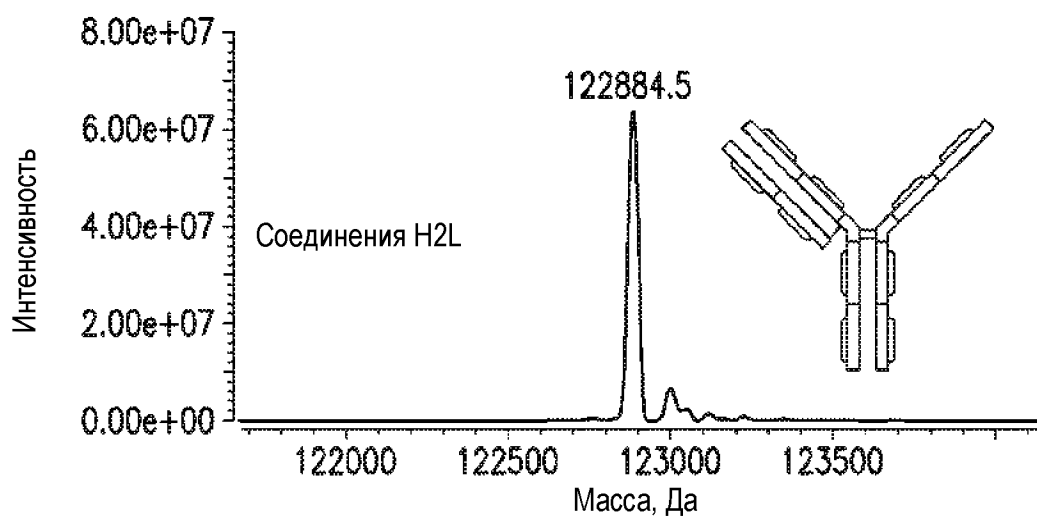
ФИГ. 5В



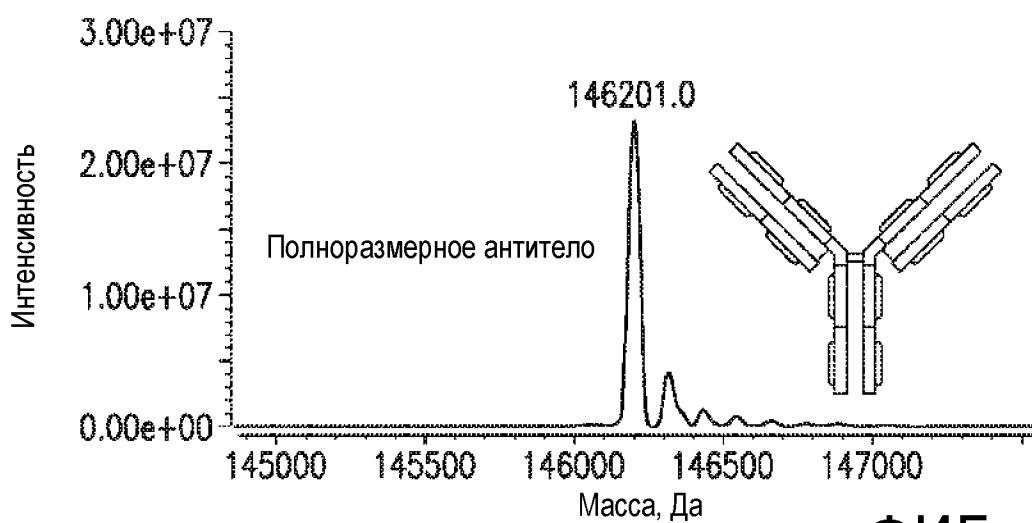
ФИГ. 5С



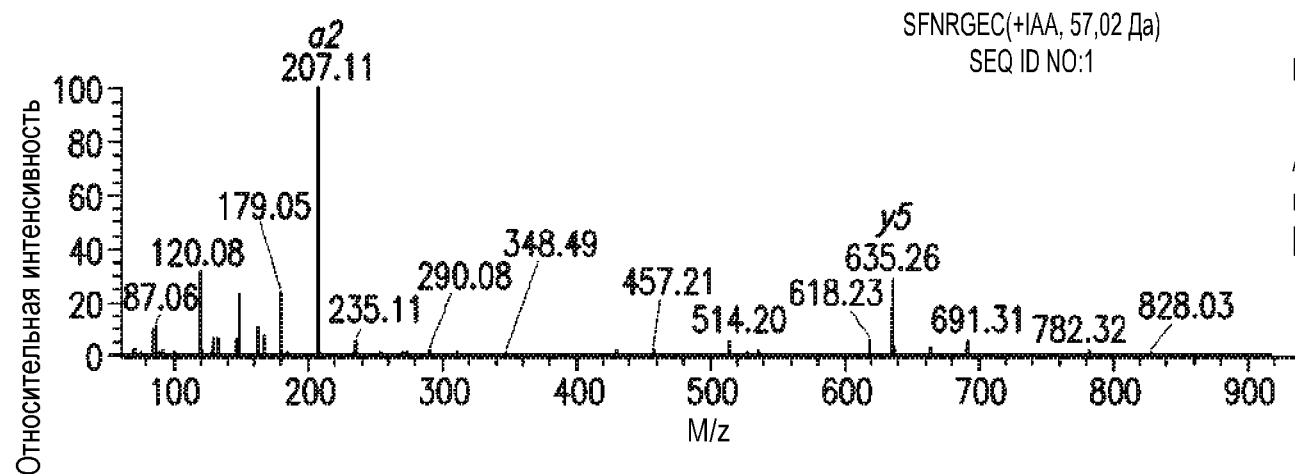
ФИГ. 5D



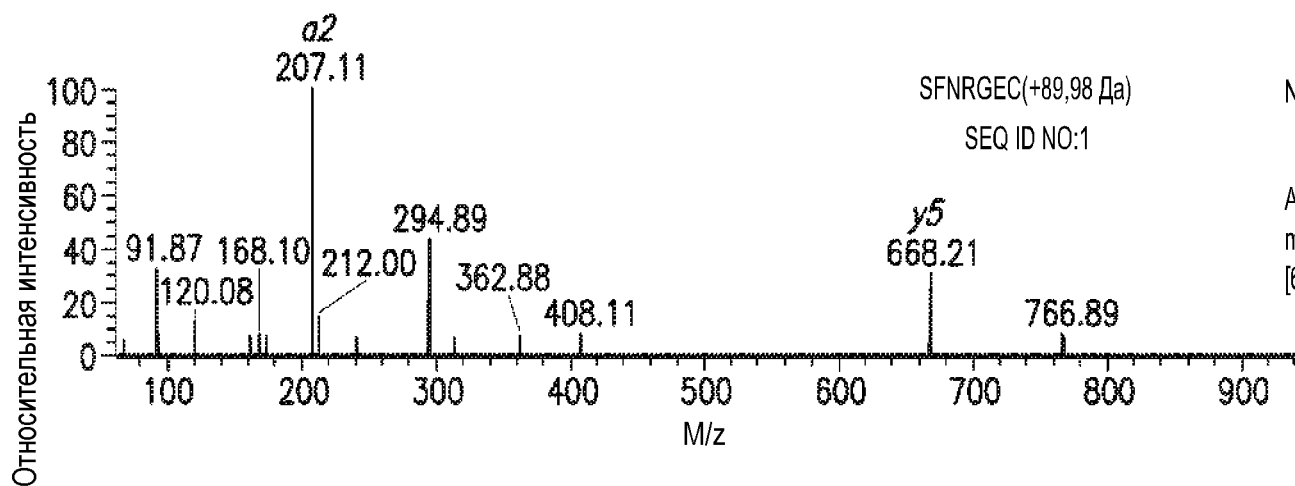
ФИГ. 5E



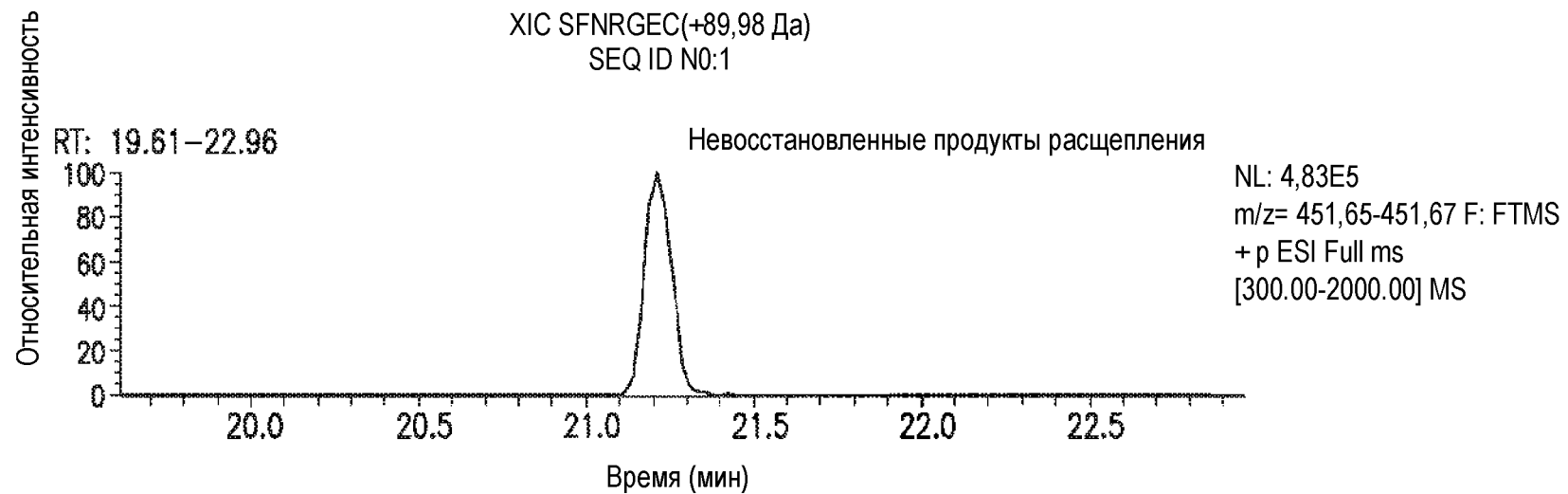
ФИГ. 5F



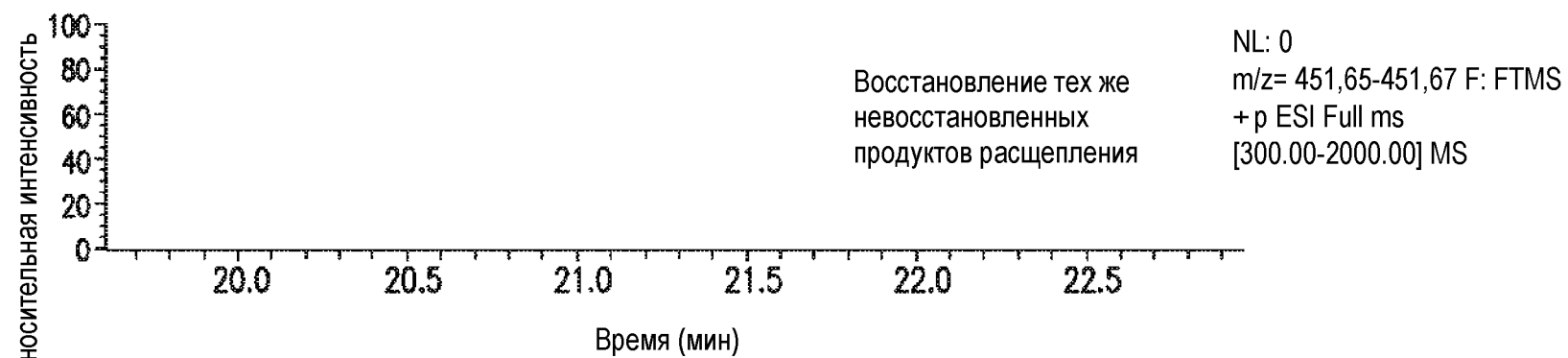
ФИГ. 6А



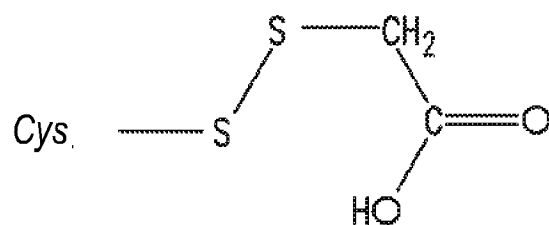
ФИГ. 6В



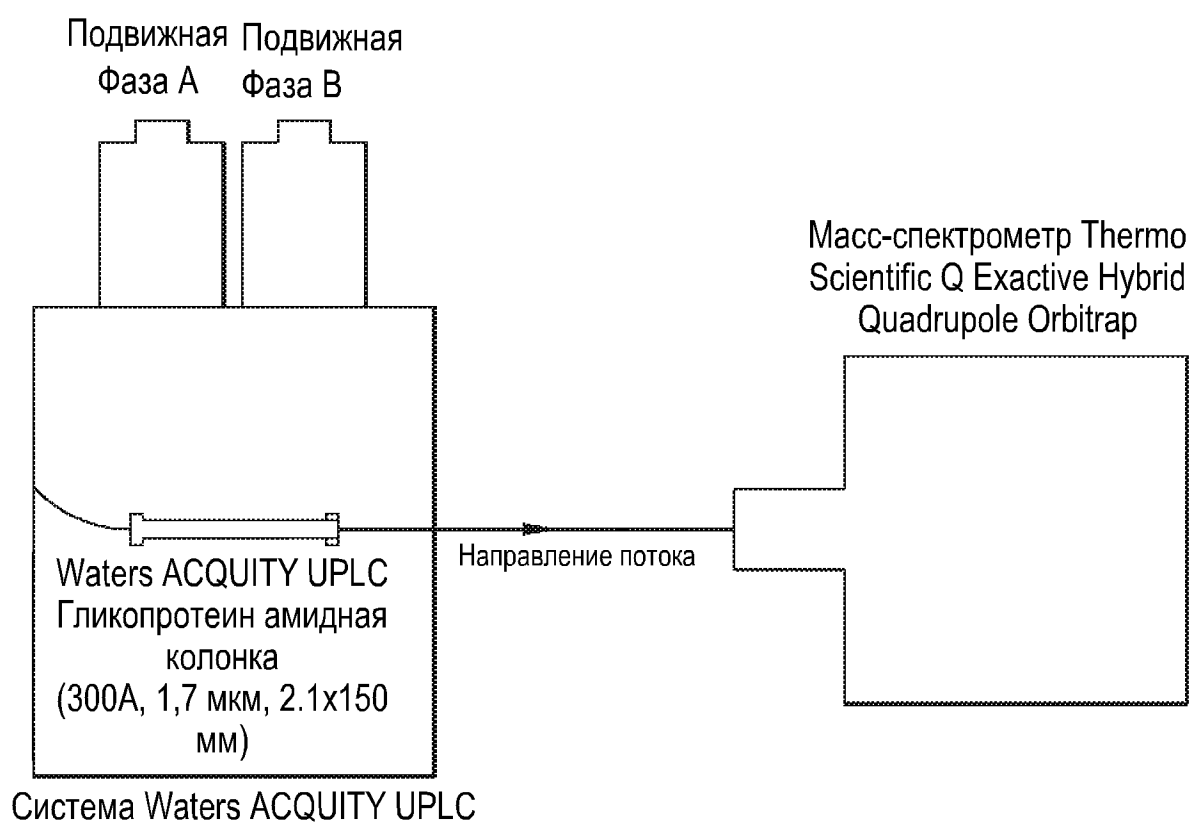
ФИГ. 7А



ФИГ. 7В



ФИГ. 8



ФИГ. 9