

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202091577** (13) **A1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.10.26

(51) Int. Cl. *C07K 16/00* (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.01.29

**(54) ГЛЮКУРОНИЛИРОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ НОВОЙ КИСЛОТНОЙ  
ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ  
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

(31) 62/624,338

(32) 2018.01.31

(33) US

(86) PCT/US2019/015549

(87) WO 2019/152356 2019.08.08

(88) 2019.10.17

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

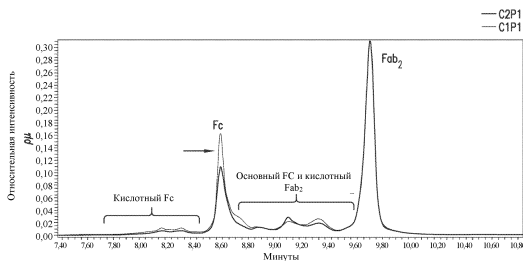
(72) Изобретатель:

**Ванг Шунхай (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Предусмотрены композиции и способы для выявления глюкурононированных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство.



202091577

A1

A1

202091577

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-563382EA/042

### **ГЛЮКУРОНИЛИРОВАНИЕ В КАЧЕСТВЕ НОВОЙ КИСЛОТНОЙ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЙ МОДИФИКАЦИИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ**

**ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ НАСТОЯЩЕЕ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Настоящее изобретение в целом относится к системам и способам выявления посттрансляционных модификаций терапевтических белков.

#### **ПРЕДПОСЫЛКИ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В фармацевтической промышленности рекомбинантные моноклональные антитела (mAb) представляют собой основной класс белковых терапевтических средств. Изменения в структуре mAb могут влиять на терапевтическую эффективность, биодоступность и клиренс, а также иммуногенные свойства терапевтических mAb. Кроме того, изменения в mAb могут влиять на безопасность и эффективность лекарственного средства. Комплексная характеристика первичной структуры, посттрансляционных модификаций (PTM) и дисульфидных связей mAb имеет решающее значение для оценки эффективности и безопасности лекарственного средства, а также понимания взаимосвязи структура/функция.

Среди различных анализов, используемых для обеспечения согласованности продуктов и процессов, ионообменная хроматография (ИЕХ) представляет собой широко используемую методику для оценки гетерогенности молекул mAb по заряду. Варианты mAb, отличающиеся зарядом, часто можно объяснить посттрансляционными модификациями (PTM), которые могут изменять поверхностный заряд молекулы mAb. Благодаря постоянно совершенствующейся методике LC-MS было выявлено много известных или новых PTM. Кроме того, был изучен их вклад в неоднородность по заряду. Несмотря на то, что улучшения технологии обеспечили множество новых PTM, все еще существует необходимость в дальнейшем изучении характеристик и обнаружении PTM, которые изменяют активность и стабильность mAb.

Следовательно, целью настоящего изобретения является обеспечение систем и способов для выявления PTM.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Предусмотрены композиции и способы для выявления глюкуронизированных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления предусмотрен способ выявления глюкуронирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем дегликозилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и обработки дегликозилированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью фермента, например FabRICATOR®, с получением одного фрагмента Fc\* (два идентичных фрагмента Fc/2, связанных вместе с помощью нековалентных взаимодействий) и одного Fab<sub>2</sub>. Затем фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют на кислотные

фракции Fc\* и Fab<sub>2</sub>. В одном варианте осуществления фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют с применением ионообменной хроматографии, например хроматографии с сильной катионообменной средой. После разделения кислотные фракции собирают, высушивают и денатурируют. Высушенные и денатурированные кислотные фракции алкилируют и затем расщепляют с помощью трипсина с получением образца. Затем образец обрабатывают с помощью NaBH<sub>4</sub> с получением восстановленного образца. Образцы как восстановленного Fc\*, так и восстановленного Fab<sub>2</sub> затем подвергают анализу методом жидкостной хроматографии с обращенной фазой/масс-спектропии для выявления глюкуронилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления способ включает стадию сравнения результатов масс-спектропии восстановленного образца и невосстановленного образца для выявления различий по массе восстановленного и невосстановленного образцов. Продукт, представляющий собой лекарственное средство, может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок. В одном варианте осуществления глюкуронилирование определяют на остатках лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

В одном варианте осуществления фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> образуют с применением рекомбинантно модифицированной формы IdeS из *Streptococcus pyogenes*, продаваемой под названием FabRICATOR®.

Раскрытый способ можно применять для контроля чистоты продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, например моноклональных антител или других терапевтических белков. В одном варианте осуществления предусмотрен способ повышения чистоты продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем осуществления анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, для выявления глюкуронилирования первичной аминогруппы одной или более аминокислот продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и удаления глюкуронилированных белков из продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением очищенного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. Глюкуронилирование можно обнаружить с применением способов, описанных выше и в примерах. В одном варианте осуществления глюкуронилированные белки определяют с помощью методик высокоэффективной жидкостной хроматографии, необязательно в сочетании с масс-спектропией. Иллюстративные методики хроматографии включают без ограничения эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, сверхэффективную жидкостную хроматографию и их комбинации. Как правило, глюкуронилирование имеет место по остатку лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ выявления посттрансляционно модифицированного продукта, представляющего собой белковое

лекарственное средство, путем проведения анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, полученного из культуры клеток млекопитающего, в отношении глюкуронилирования, при этом наличие глюкуронилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, указывает на то, что продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит посттрансляционные модификации. Культура клеток млекопитающего обычно содержит клетки яичника китайского хомячка.

В еще одном варианте осуществления предусмотрен продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий терапевтический белок, где глюкуронилированы менее 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 6,0%, 7,0%, 8,0%, 9,0% или 10% аминокислот терапевтического белка. В одном варианте осуществления аминокислота представляет собой лизин. Как правило, терапевтический белок представляет собой моноклональное антитело, рекомбинантный белок или слитый белок.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигуры 1A-1F представляют собой хроматограммы, на которых показаны результаты анализа вариантов Fab<sub>2</sub>, отличающихся зарядом, для иллюстративного mAb. Фигуры 1G-1P представляют собой хроматограммы, на которых показаны результаты анализа вариантов Fc, отличающихся зарядом, для иллюстративного mAb.

Фигура 2 представляет собой хроматограмму, на которой показано разделение кислотного Fc, основного Fc и кислотного Fab<sub>2</sub>.

На фигуре 3A показаны спектры фрагментации MS<sup>2</sup> для образцов без обработки с помощью NaBH<sub>4</sub>. На фигуре 3B показаны спектры фрагментации MS<sup>2</sup> для образцов, обработанных с помощью NaBH<sub>4</sub>.

Фигура 4A представляет собой хроматограмму, полученную с применением колонки WCX. Стрелка указывает на искусственную обработку глюкуроновой кислотой. Фигура 4B представляет собой график, на котором показаны результаты для контроля Fab<sub>2</sub>. Фигура 4C представляет собой график, на котором показаны результаты для Fab<sub>2</sub>, обработанного глюкуроновой кислотой. Фигура 4D представляет собой график, на котором показаны результаты для контроля Fc. Фигура 4E представляет собой график, на котором показаны результаты для Fc, обработанного глюкуроновой кислотой.

Фигура 5A представляет собой хроматограмму нативного образца, на которой показано существовавшее ранее глюкуронилирование. Фигура 5B представляет собой хроматограмму образца, обработанного глюкуроновой кислотой, на которой показано искусственное глюкуронилирование. На фигуре 5C показаны результаты спектров фрагментации M<sup>2</sup> для существовавшего ранее глюкуронилирования. На фигуре 5D показаны результаты спектров фрагментации M<sup>2</sup> для образцов, обработанных глюкуроновой кислотой.

Фигура 6A представляет собой хроматограмму второго образца. Фигура 6B представляет собой хроматограмму второго образца, обработанного глюкуроновой кислотой, на которой показано искусственное глюкуронилирование. На фигуре 6C

показаны результаты спектров фрагментации M2 для существовавшего ранее глюкуронилирования. На фигуре 6D показаны результаты спектров фрагментации M2 для образцов, обработанных глюкуроновой кислотой.

Фигура 7A представляет собой хроматограмму третьего образца. Фигура 7B представляет собой хроматограмму третьего образца, обработанного глюкуроновой кислотой, на которой показано искусственное глюкуронилирование. На фигуре 7C показаны результаты спектров фрагментации M2 для существовавшего ранее глюкуронилирования. На фигуре 7D показаны результаты спектров фрагментации M2 для образцов, обработанных глюкуроновой кислотой.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### I. Определения

Используемый в данном документе термин «антитело» предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена в «вариабельной области». Термин «вариабельная область» предназначен для того, чтобы отличать такой домен иммуноглобулина от доменов, которые в целом являются общими для антител (таких как Fc-домен антител). Вариабельная область включает «гипервариабельную область», остатки в которой отвечают за связывание с антигеном. Гипервариабельная область включает аминокислотные остатки из «области, определяющей комплементарность» или «CDR» (т. е. обычно остатки в положениях примерно 24-34 (L1), 50-56 (L2) и 89-97 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и остатки в положениях примерно 27-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или те остатки из «гипервариабельной петли» (т. е. остатки 26-32 (L1), 50-52 (L2) и 91-96 (L3) в вариабельном домене легкой цепи и 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Остатки «каркасной области» или «FR» представляют собой такие остатки в вариабельном домене, которые отличаются от остатков в гипервариабельной области, определенных в данном документе.

Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело (mAb)» относится к антителу, которое получено с помощью идентичных иммунных клеток, которые являются клонами уникальной родительской клетки, которая специфически связывает целевое вещество. mAb становятся все более популярными в качестве терапевтических средств для лечения различных заболеваний, включая без ограничения виды рака, артрит, астму, колит, аутоиммунные заболевания и инфекции. mAb представляют собой крупные белки со значениями молекулярной массы примерно 150 кДа, и при этом они составлены из двух идентичных тяжелых цепей (HC) по  $\approx$  50 кДа и двух идентичных легких цепей (LC) по  $\approx$  25 кДа. Они также содержат по меньшей мере 16 дисульфидных связей, которые поддерживают трехмерную структуру и биологическую активность. Несмотря на то, что они имеют сходные вторичные белковые структуры,

разные mAb сильно различаются по последовательности переменных областей, особенно в областях, определяющих комплементарность (CDR), которые ответственны за разнообразие и специфичность связывания антитело-антиген.

Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одной или более частям антитела, которые содержат области антитела, определяющие комплементарность («CDR»), и необязательно остатки каркасной области, которые включают сайт распознавания антигена в «вариабельной области» антитела и проявляют способность иммуноспецифически связывать антиген. Такие фрагменты включают Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, одноцепочечный фрагмент (ScFv) и их мутантные формы, встречающиеся в природе варианты и слитые белки, содержащие сайт распознавания антигена в «вариабельной области» антитела и гетерологичный белок (например, токсин, сайт распознавания антигена для другого антигена, фермент, рецептор или лиганд рецептора и т. д.).

Используемый в данном документе термин «ионообменная хроматография (ИЕХ)» относится к способу разделения ионизируемых молекул на основе их общего заряда. Белки состоят как из положительно, так и отрицательно заряженных химических групп. В зависимости от значения pH окружающей среды белки могут нести суммарный положительный заряд, суммарный отрицательный заряд или не иметь заряда. Значение pH, при котором молекула не имеет заряда, называется изоэлектрической точкой (pI). Суммарный заряд белка, представляющего интерес, рассчитывается путем объединения изоэлектрической точки, которая может быть рассчитана на основе первичной последовательности молекулы, и значения pH буфера. Когда в колонку ИЕХ загружен образец с определенным pH, все белки, которые заряжены соответствующим образом, будут связываться с ионообменной смолой в колонке. Например, белок с суммарным отрицательным зарядом будет улавливаться колонкой с анионообменной смолой.

Используемый в данном документе термин «варианты, отличающиеся зарядом» относится к изоформам и вариантам белка с измененной изоэлектрической точкой (pI) или зарядом по сравнению с немодифицированной формой. Варианты, отличающиеся зарядом, с относительно более низкой pI называются «кислотными вариантами», в то время как варианты, отличающиеся зарядом, с относительно более высокой pI называются «основными вариантами». Варианты, отличающиеся зарядом, могут влиять на свойства антител, включая изменение способности mAb связывать белки или мишени на клеточной оболочке. Это может повлиять на проникновение в ткани, распределение в тканях и фармакокинетику антител. Примеры вариантов, отличающихся зарядом, включают без ограничения продукты дезамидирования, образования N-концевого пироглутамата, агрегации, изомеризации, сиалилирования гликанов, фрагментации антител и гликирования в остатках лизина.

Используемый в данном документе термин «посттрансляционная модификация (PTM)» относится к биохимическим модификациям, которые происходят с одной или более аминокислотами в белке после биосинтеза белка. PTM играет важную роль в

клеточной функции посредством регуляции фолдинга белков, нацеливания белков на специфические клеточные компартменты или посредством регуляции взаимодействия между лигандами и другими белками. Наиболее распространенные модификации представляют собой специфическое расщепление белков-предшественников; образование дисульфидных связей; или ковалентное добавление или удаление низкомолекулярных групп, что приводит к таким модификациям, как ацетилирование, амидирование, биотинилирование, цистеинилирование, деамидирование, фарнезилирование, формилирование, геранилирование, глутатионилирование, гликирование (конъюгация с углеводами без участия ферментов), гликозилирование (ферментативная конъюгация с углеводами), гидроксилирование, метилирование, моно-ADP-рибозилирование, миристоилирование, окисление, пальмитоилирование, фосфорилирование, поли-ADP-рибозилирование, стеароилирование или сульфатирование. Убиквитинилирование является еще одной распространенной РТМ, которая важна в путях разложения белков. Некоторые РТМ обратимы под действием деконъюгирующих ферментов.

Используемый в данном документе термин «N-связанное гликозилирование» относится к посттрансляционной модификации белка. N-связанное гликозилирование представляет собой присоединение олигосахаридов к атому азота, обычно к N4 остатков аспарагина. Все N-связанные углеводы связаны через N-ацетилглюкозамин и аминокислоту аспарагин.

Используемый в данном документе термин «пептидное картирование» относится к методике определения характеристик белков и изучения их первичных аминокислотных структур. Это широко применяемая методика для определения характеристик моноклональных антител и других фармацевтических препаратов на основе рекомбинантных белков.

Используемый в данном документе термин «глюкуронидирование» относится к реакции конъюгации, где глюкуроновая кислота, полученная из кофактора UDP-глюкуроновой кислоты, ковалентно связывается с субстратом, содержащим нуклеофильную функциональную группу.

## **II. Способы выявления глюкуронилирования и способы его применения**

### **A. Идентификация глюкуронилирования**

Предусмотрены композиции и способы для выявления глюкуронилированных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство. В примерах 1-3 представлено подробное описание способов, которые применяют для обнаружения и выявления глюкуронилированных аминокислот в терапевтических белках. Как правило, один способ выявления глюкуронилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, включает дегликозилирование продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и обработку дегликозилированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью FabRICATOR® с получением одного фрагмента Fc\* (два идентичных фрагмента Fc/2, связанных вместе с помощью нековалентных взаимодействий) и одного фрагмента Fab<sub>2</sub>. В одном варианте

осуществления фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> получают с применением рекомбинантного фермента IdeS из *Streptococcus pyogenes*, продаваемого под названием FabRICATOR®.

Затем фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют на кислотные фракции Fc\* и Fab<sub>2</sub>. В одном варианте осуществления фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют с применением ионообменной хроматографии, например хроматографии с сильной катионообменной средой. Как описано в примере 1, аликвоту дегликозилированного образца mAb (~ 50 мкг) вводили в сильную катионообменную колонку (SCX) YMC-BioPro SP-F (100 × 4,6 мм), соединенную с масс-спектрометром Thermo Exactive Plus EMR или масс-спектрометром Thermo Q Exactive plus для измерения массы. Образцы разделяли и элюировали в течение 20 минут с градиентом pH с помощью буферов на основе ацетата аммония (буфер А: 20 мМ ацетата аммония, значение pH 5,8; буфер В: 200 мМ ацетата аммония, значение pH 7,6). После колонки SCX был подключен аналитический делитель потока (отношение ~ 200:1) для уменьшения скорости аналитического потока до ~ 2 мкл/мин. перед применением масс-спектрометра для определения массы. Интенсивный поток из делителя был отведен на детектор с фотодиодной матрицей (PDA) Waters ACQUITY для одновременного УФ-детектирования (280 нм). В результате был обнаружен пик плеча кислотной кривой, который был приписан варианту антитела с увеличением массы на приблизительно 176 Да.

После разделения кислотные фракции собирают, высушивают и денатурируют. В одном варианте осуществления собранные кислотные фракции сначала высушивают в SpeedVac™, а затем денатурируют и восстанавливают в 20 мкл раствора, содержащего 5 мМ дитиотреитола (DTT), 8 М мочевины и 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), посредством нагревания при 50°C течение 30 минут. Следует понимать, что специалисту в данной области техники будет понятно, что для высушивания и денатурирования кислотных фракций можно применять другие восстанавливающие средства, денатурирующие средства и значения температуры.

Высушенные и денатурированные кислотные фракции алкилируют и затем ферментативно расщепляют, например с помощью трипсина, с получением образца. Кислотные фракции можно алкилировать посредством инкубирования их в 10 мМ йодацетамиде (IAA) при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Расщепление фракций может быть достигнуто путем разбавления их с помощью 175 мкл 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и добавления трипсина при соотношении фермента к субстрату 1:10 (вес/вес) при 37°C в течение 4 часов.

Затем расщепленную трипсином кислотную фракцию инкубируют с 50 мМ NaBH<sub>4</sub> при 37°C в течение 1 часа перед гашением 10% муравьиной кислотой (FA) с получением восстановленного образца. Восстановленный образец затем подвергают анализу методом жидкостной хроматографии с обращенной фазой/масс-спектроскопии для выявления глюкуронылирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления способ включает стадию сравнения результатов масс-спектроскопии восстановленного образца и невосстановленного образца



для выявления различий по массе восстановленного и невосстановленного образцов. Продукт, представляющий собой лекарственное средство, может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок. В одном варианте осуществления гликозилирование определяют на остатках лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

#### **В. Способы повышения чистоты продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство.**

Раскрытые способы можно применять для контроля чистоты продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, например моноклональных антител или других терапевтических белков. В одном варианте осуществления предусмотрен способ повышения чистоты продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем осуществления анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, для выявления гликозилирования первичной аминогруппы одной или более аминокислот продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и удаления гликозилированных белков из продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением очищенного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. Гликозилирование можно обнаружить с применением способов, описанных выше и в примерах. В одном варианте осуществления гликозилированные белки удаляют с помощью методик высокоэффективной жидкостной хроматографии, необязательно в сочетании с масс-спектрометрией. Иллюстративные методики хроматографии включают без ограничения эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, сверхэффективную жидкостную хроматографию и их комбинации. Как правило, гликозилирование имеет место по остатку лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

В другом варианте осуществления предусмотрен способ выявления посттрансляционно модифицированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем проведения анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, полученного из культуры клеток млекопитающего, в отношении гликозилирования, при этом наличие гликозилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, указывает на то, что продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит посттрансляционные модификации. Культура клеток млекопитающего обычно содержит клетки яичника китайского хомячка.

#### **С. Продукты, представляющие собой белковое лекарственное средство**

В еще одном варианте осуществления предусмотрен продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий терапевтический белок, где гликозилированы менее 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0%, 6,0%, 7,0%, 8,0%, 9,0% или 10% аминокислот терапевтического белка. Процент гликозилирования можно определить с

применением раскрытых способов. В одном варианте осуществления аминокислота представляет собой лизин. Как правило, терапевтический белок представляет собой моноклональное антитело или слитый белок.

Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, рекомбинантный белок или слитый белок. Антитело предпочтительно представляет собой моноклональное антитело.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Идентификация модификаций на интактном уровне антител**

#### Способы

mAb подвергали анализу IEX-MS, происходящему в реальном времени. Аликвоту дегликозилированного образца mAb (~ 50 мкг) вводили в сильную катионообменную колонку (SCX) YMC-BioPro SP-F (100 × 4,6 мм), соединенную с масс-спектрометром Thermo Exactive Plus EMR или масс-спектрометром Thermo Q Exactive plus для измерения массы. Образцы разделяли и элюировали в течение 20 минут с градиентом pH с помощью буферов на основе ацетата аммония (буфер А: 20 mM ацетата аммония, значение pH 5,8; буфер В: 200 mM ацетата аммония, значение pH 7,6). После колонки SCX был подключен аналитический делитель потока (отношение ~ 200:1) для уменьшения скорости аналитического потока до ~ 2 мкл/мин. перед применением масс-спектрометра для определения массы. Интенсивный поток из делителя был отведен на детектор с фотодиодной матрицей (PDA) Waters ACQUITY для одновременного УФ-детектирования (280 нм).

#### Результаты

В результате был обнаружен пик плеча кислотной кривой, который был приписан варианту антитела с увеличением массы на приблизительно 176 Да. Однако измерение массы на интактном уровне не было точным из-за осложнений, обусловленных продуктами модификации путем гликирования, которые элюируются в том же пике плеча кислотной кривой и являются близкими по массе (162 Да).

### **Пример 2. Обнаружение новой кислотной модификации на субдоменном уровне антител**

#### Способы

Чтобы увеличить разрешение кислотного пика до главного пика и повысить точность измерения массы, образец дегликозилированного mAb обрабатывали с помощью FabRICATOR, фермента, который расщепляет тяжелую цепь на С-конце двух дисульфидных связей в шарнирной области.

#### Результаты

Эта обработка привела к получению одного фрагмента Fab<sub>2</sub> и двух идентичных фрагментов Fc/2, которые связаны друг с другом посредством нековалентных связей (Fc\*). Аликвоту продукта расщепления подвергали анализу IEX-MS, происходящему в реальном времени, как описано выше. Как и ожидалось, одинаковый кислотный вариант с

увеличением массы на ~176 Да обнаружили в кислотных пиках как Fab2, так и Fc\* (фиг. 1A-1P).

### **Пример 3. Идентификация и подтверждение новой кислотной модификации**

#### Способы

Чтобы дополнительно идентифицировать сайты модификации аминокислотных остатков и получить точную массу этой неизвестной модификации, кислотные фракции фрагментов Fc\* и Fab2 собирали из колонки SCX для анализа методом пептидного картирования. Собранные кислотные фракции сначала высушивали в SpeedVac, а затем денатурировали и восстанавливали в 20 мкл раствора, содержащего 5 mM дитиотреитола (DTT), 8 M мочевины и 100 mM Tris-HCl (pH 7,5), посредством нагревания при 50°C течение 30 минут. Образцы затем алкилировали с помощью 10 mM йодацетамида (IAA) посредством инкубирования при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Восстановленные и алкилированные образцы затем разбавляли с помощью 175 мкл 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) и расщепляли с помощью трипсина при соотношении фермента к субстрату 1:10 (вес/вес) при 37°C в течение 4 часов. Расщепление останавливали путем добавления 4 мкл 10% FA. Аликвоты каждого образца расщепленного белка затем разделяли с помощью RP-UPLC с последующим анализом MS, происходящим в реальном времени. Эксперименты MS и MS/MS проводили на системе Thermo Q Exactive Plus MS с высокоэнергетичной столкновительной диссоциацией (HCD), применяемой для фрагментации пептидов во время экспериментов MS/MS. Затем в файлах исходных данных MS проводился поиск по базе данных, содержащей последовательность mAb и переменную безразличную модификацию массой от 170 до 180 Да.

#### Результаты

Результаты показали, что эта неизвестная модификация характеризовалась моноизотопной массой +176,03 Да и имела место при низких уровнях нескольких остатков Lys в последовательности mAb (фигура 2). Основываясь на точной дельта-массе, эта модификация предположительно имела тот же элементный состав (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), что и продукт глюкуроноидирования, которое, однако, как сообщалось, происходит на остатках Ser и Thr посредством O-связи, катализируемой UDP-глюкуронозилтрансферазой.

Расщепленную трипсином кислотную фракцию инкубировали с 50 mM NaBH<sub>4</sub> при 37°C в течение 1 часа перед гашением 10% муравьиной кислотой (FA). Образец, обработанный с помощью NaBH<sub>4</sub>, затем подвергали анализу методом RP LC/MS. Результат показал, что эта модификация (+176 Да) может быть восстановлена (+178 Да) с помощью NaBH<sub>4</sub>, что указывает на присутствие структуры основания Шиффа в данной модификации (фигуры 3A-3B).

Искусственное глюкуроноилирование осуществляли посредством инкубирования образца mAb со 100 mM глюкуроновой кислоты при 37°C в течение 24 часов.

Последующее расщепление трипсином и анализ методом пептидного картирования показали, что ряд глюкуроноилированных пептидов, присутствующих в гораздо большем количестве в образцах с искусственной модификацией, демонстрирует такие же точные

массы, спектры фрагментации MS2 и значения времени удерживания, как и такие в необработанном образце (фигуры 4A-4E, 5A-5D, 6A-6D и 7A-7D).

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выявления глюкуронилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, включающий

дегликозилирование продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство;

обработку дегликозилированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением одного фрагмента  $Fc^*$ , содержащего два идентичных фрагмента  $Fc/2$ , связанных вместе посредством нековалентных взаимодействий, и одного фрагмента  $Fab_2$ , предусматривающего один фрагмент  $Fab_2$ ;

разделение комплексов  $Fc^*$  и  $Fab_2$  с применением ионообменной хроматографии на кислотные фракции  $Fc^*$  и  $Fab_2$ ;

высушивание и денатурирование кислотных фракций;

алкилирование кислотных фракций;

расщепление кислотных фракций с помощью трипсина с получением образца;

инкубирование образца с  $NaBH_4$  с получением восстановленного образца; и

подвергание восстановленного образца анализу методом жидкостной хроматографии с обращенной фазой/масс-спектропии для выявления глюкуронилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию сравнения результатов анализа методом масс-спектропии для восстановленного образца и невосстановленного образца для выявления различий по массе между восстановленным и невосстановленным образцами.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит моноклональное антитело.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где фрагменты  $Fc^*$  и  $Fab_2$  получают с применением рекомбинантно модифицированной формы IdeS из *Streptococcus pyogenes*.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где ионообменная хроматография представляет собой хроматографию с сильной катионообменной средой.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где кислотные фракции алкилируют с помощью йодацетамида.

7. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий терапевтический белок, где глюкуронилированы менее 10% аминокислот терапевтического белка.

8. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по п. 7, где глюкуронилированы менее 5% аминокислот терапевтического белка.

9. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по п. 7 или п. 8, где аминокислоты представляют собой аминокислоту лизин.

10. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по любому из пп. 7-9, где терапевтический белок представляет собой антитело или слитый белок.

11. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, по п. 10, где антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

12. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержащий терапевтический белок, где глюкуронилированы менее 3% аминокислот, представляющих собой лизин, терапевтического белка.

13. Способ повышения чистоты продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, включающий

осуществление анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, для выявления глюкуронилирования первичной аминогруппы одной или более аминокислот продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство; и

удаление глюкуронилированных белков из продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением очищенного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

14. Способ по п. 13, где глюкуронилированные белки удаляют посредством методик высокоэффективной жидкостной хроматографии.

15. Способ по п. 14, где методики хроматографии выбраны из группы, состоящей из эксклюзионной хроматографии, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии и их комбинаций.

16. Способ по п. 15, где методику хроматографии применяют в сочетании с анализом методом масс-спектропии.

17. Способ по любому из пп. 13-16, где аминокислоты представляют собой аминокислоту лизин.

18. Способ по любому из пп. 13-17, где терапевтический белок представляет собой антитело или слитый белок.

19. Способ по п. 18, где антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

20. Способ выявления посттрансляционно модифицированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, включающий

проведение анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, полученного из культуры клеток млекопитающего, в отношении глюкуронилирования, при этом наличие глюкуронилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, указывает на то, что продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, содержит посттрансляционные модификации.

21. Способ по п. 20, где культура клеток млекопитающего содержит клетки яичника китайского хомячка.

22. Способ по п. 20 или п. 21, где глюкуронилирование имеет место по аминокислотам, представляющим собой лизин, продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

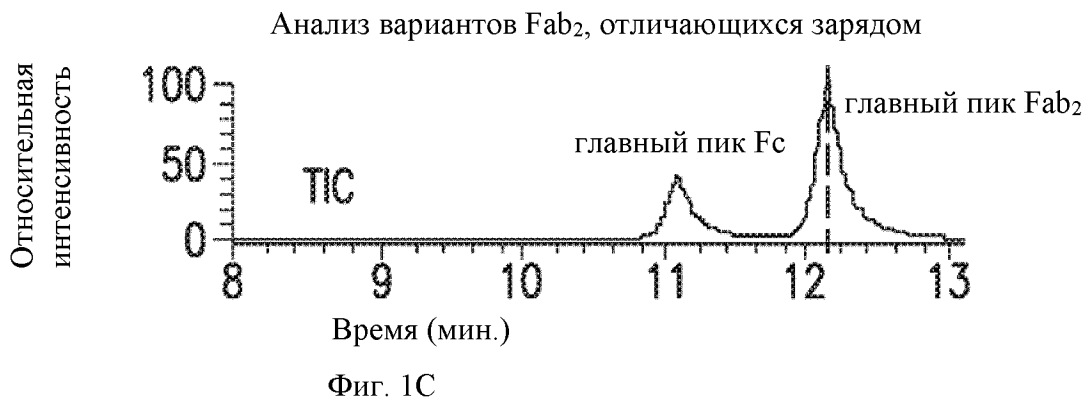
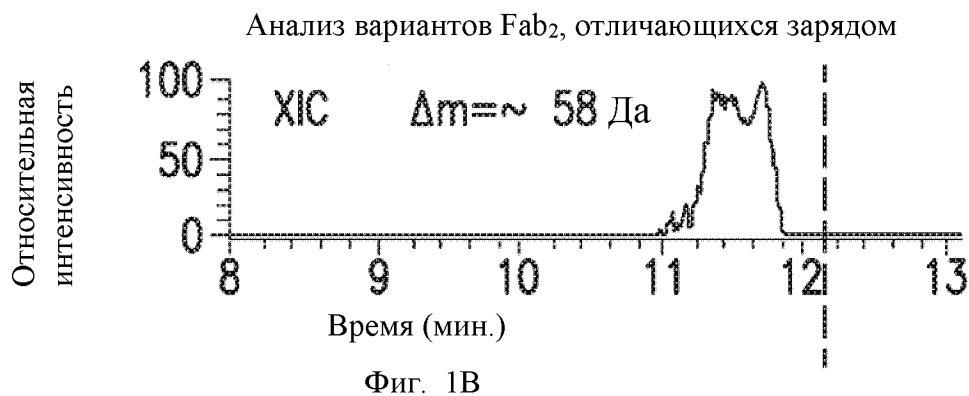
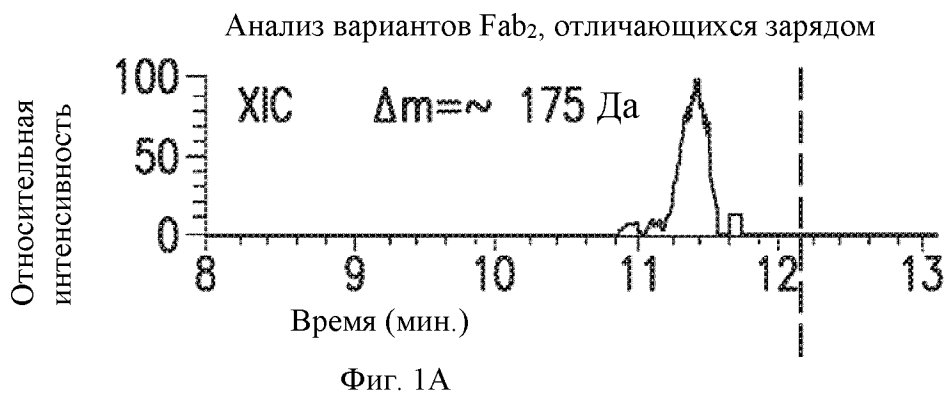
23. Способ по любому из пп. 20-22, где продукт, представляющий собой белковое

лекарственное средство, представляет собой антитело или слитый белок.

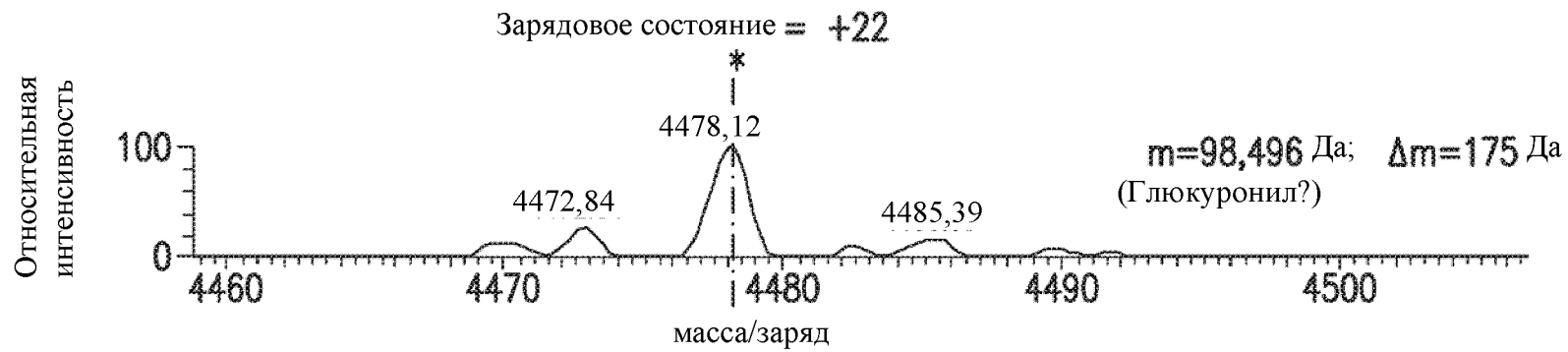
24. Способ по любому из пп. 23, где антитело представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

По доверенности

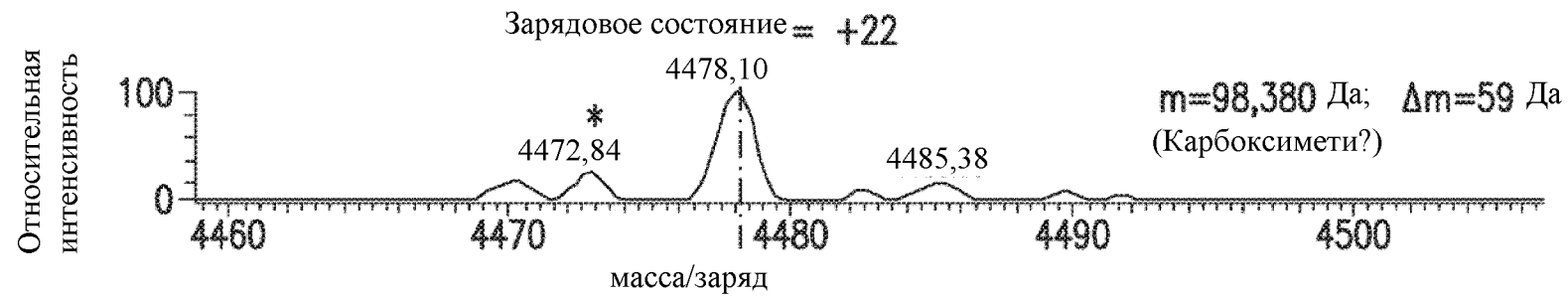
1/17







Фиг. 1D



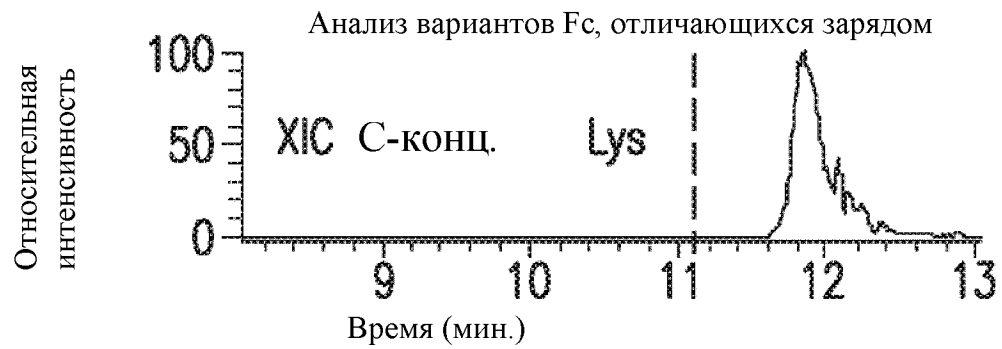
Фиг. 1E



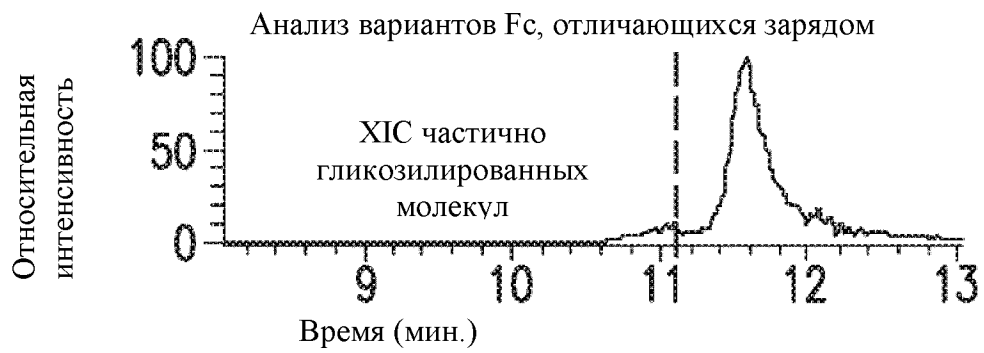
Фиг. 1F



Фиг. 1G



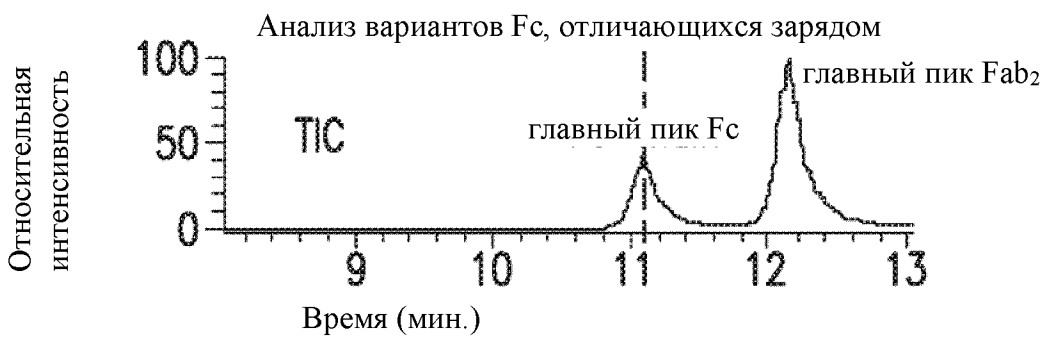
Фиг. 1H



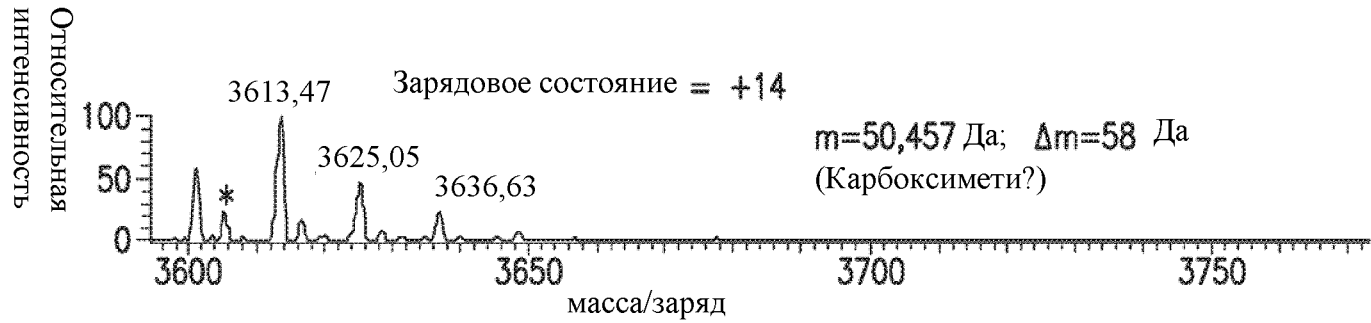
Фиг. 1I



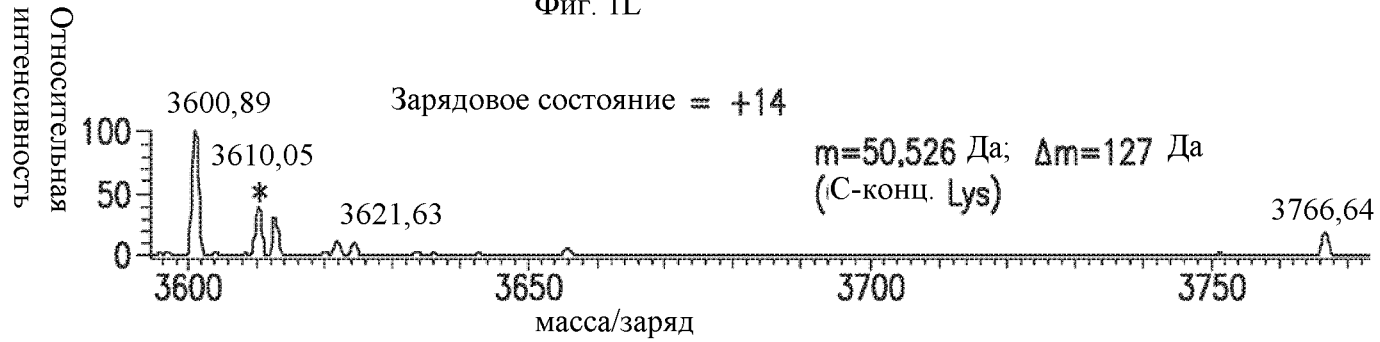
Фиг. 1J



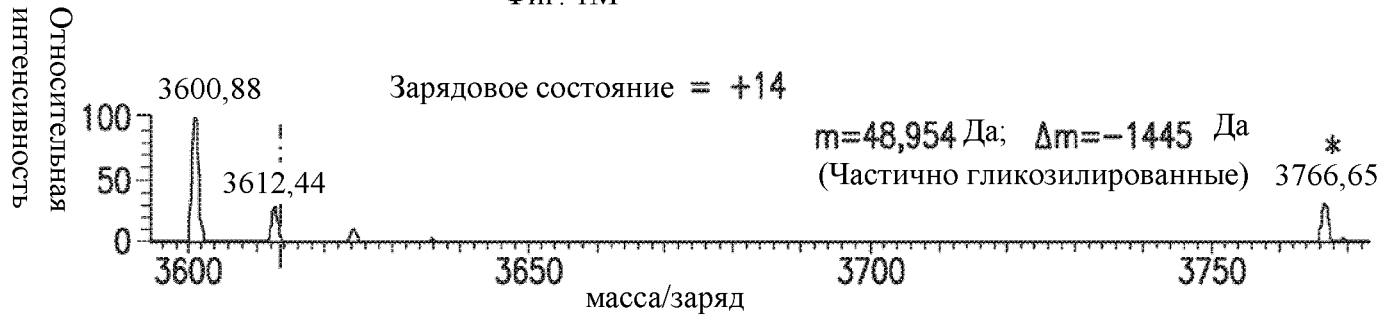
Фиг. K



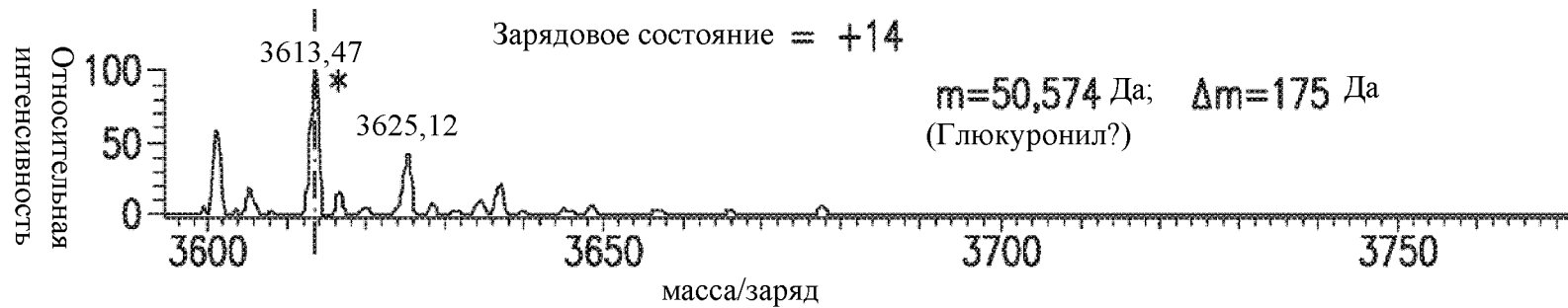
Фиг. 1L



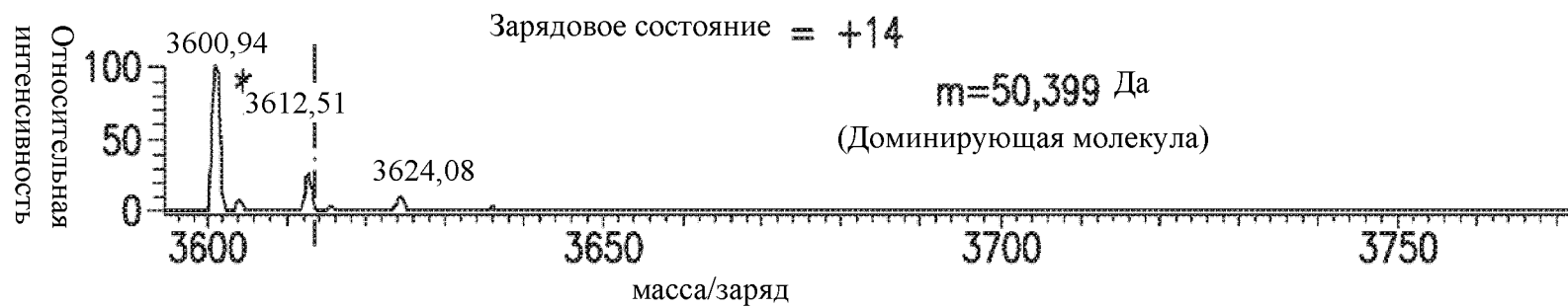
Фиг. 1M



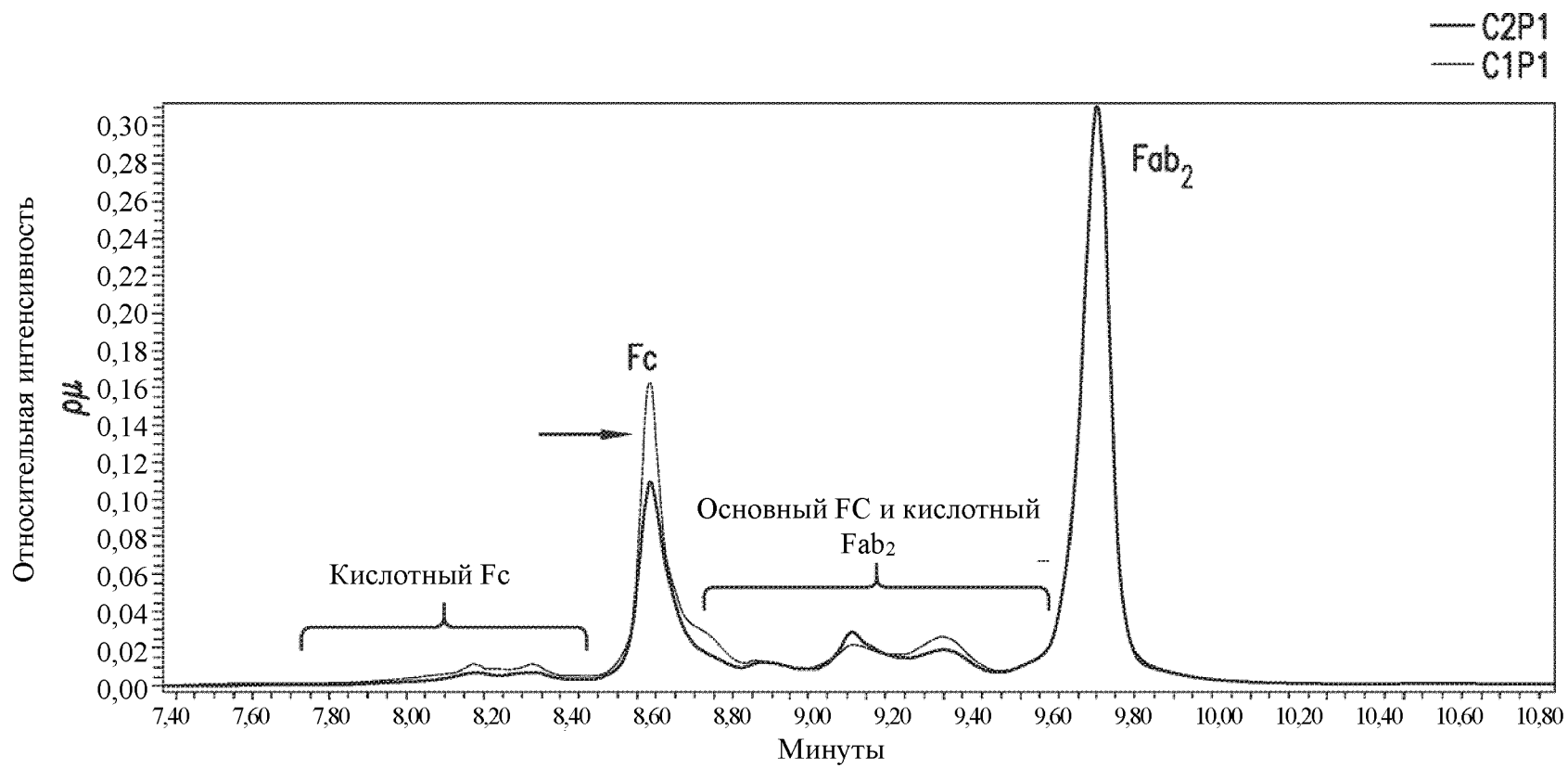
Фиг. 1N



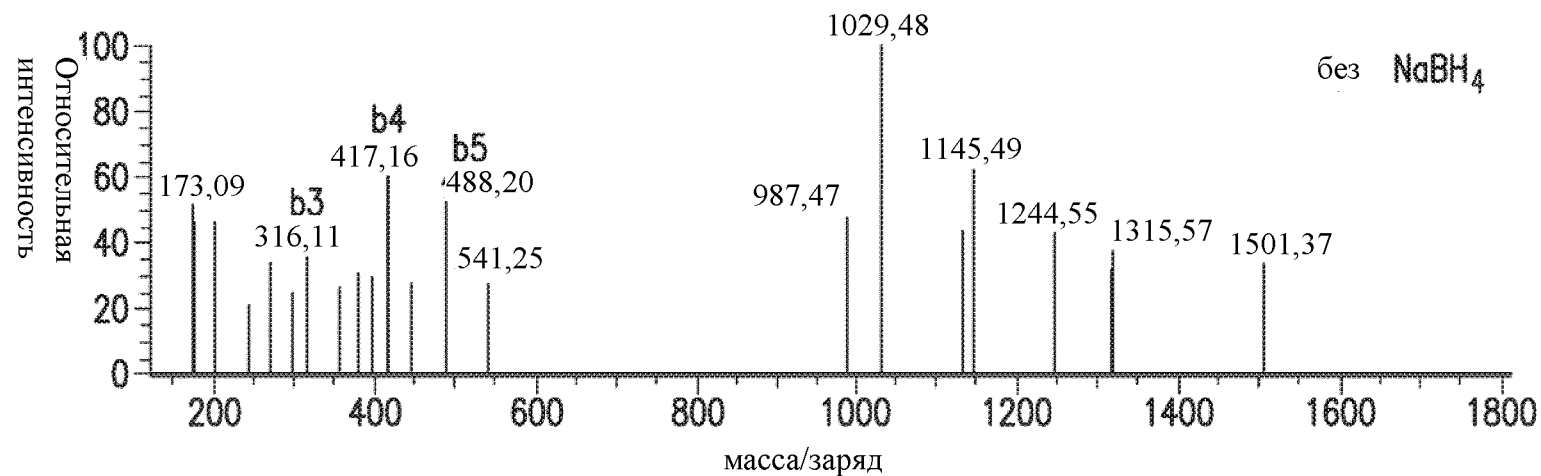
Фиг. 10



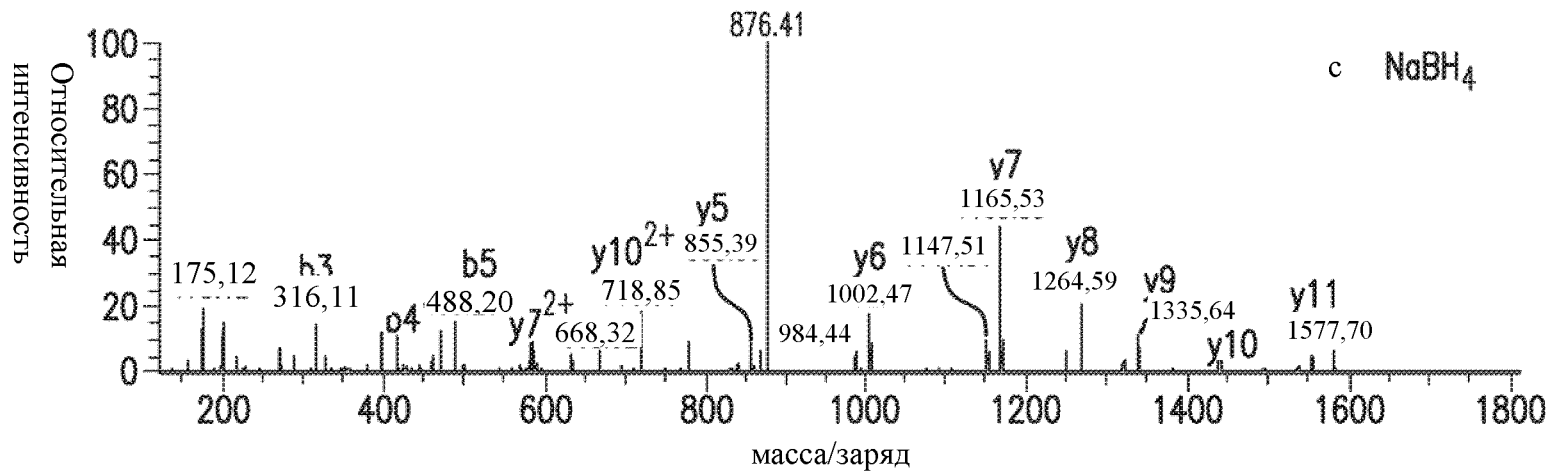
Фиг. 1P



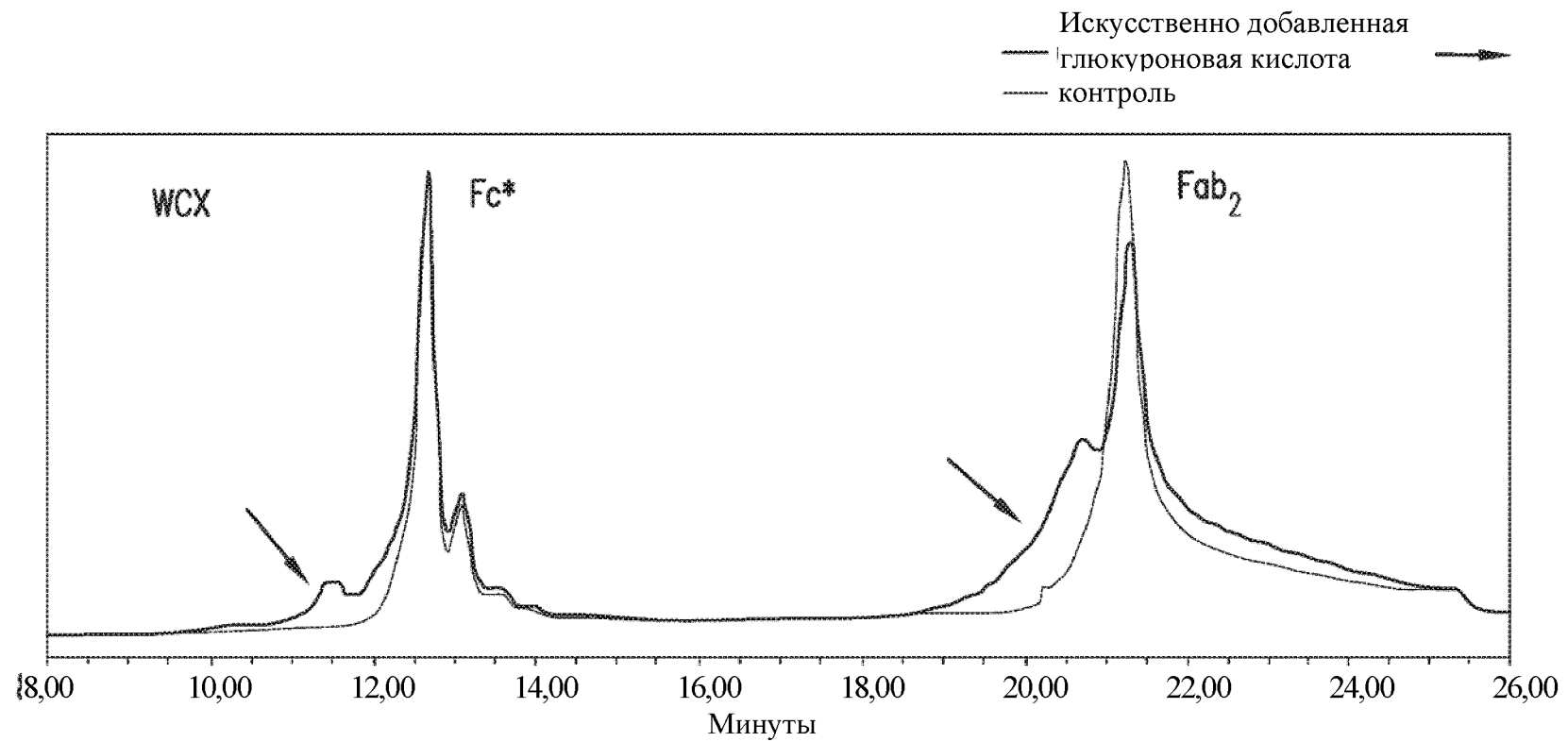
Фиг. 2



Фиг. 3А

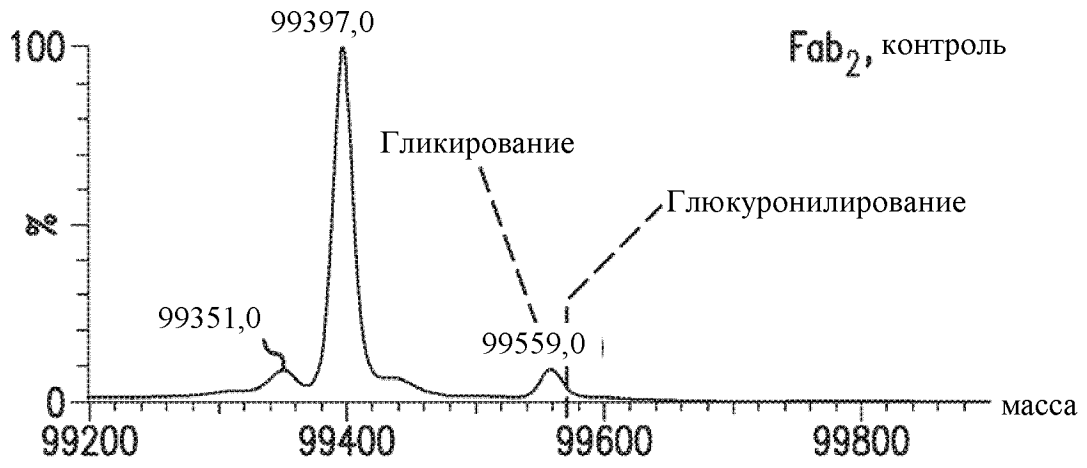


Фиг. 3В

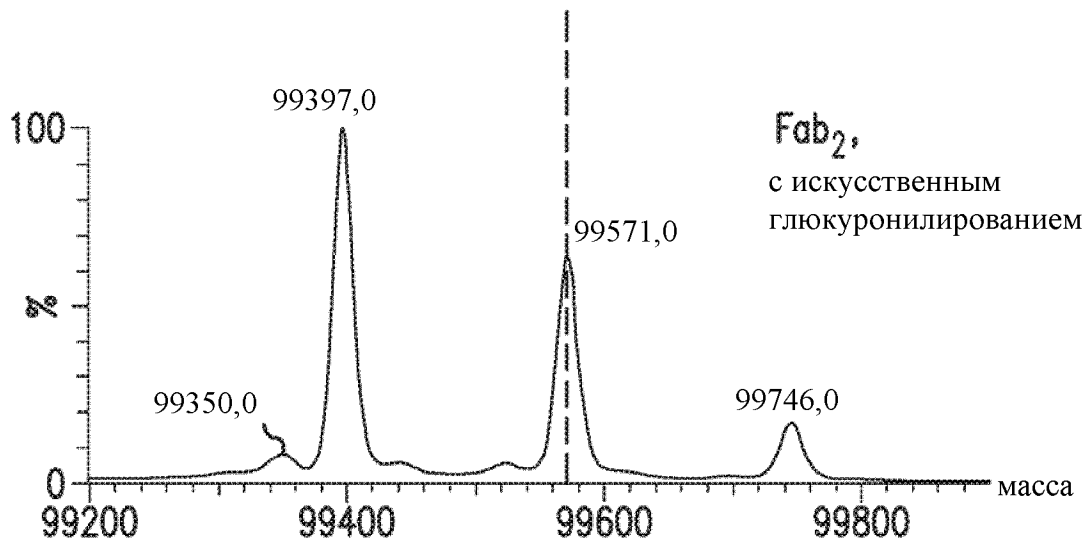


Фиг. 4А

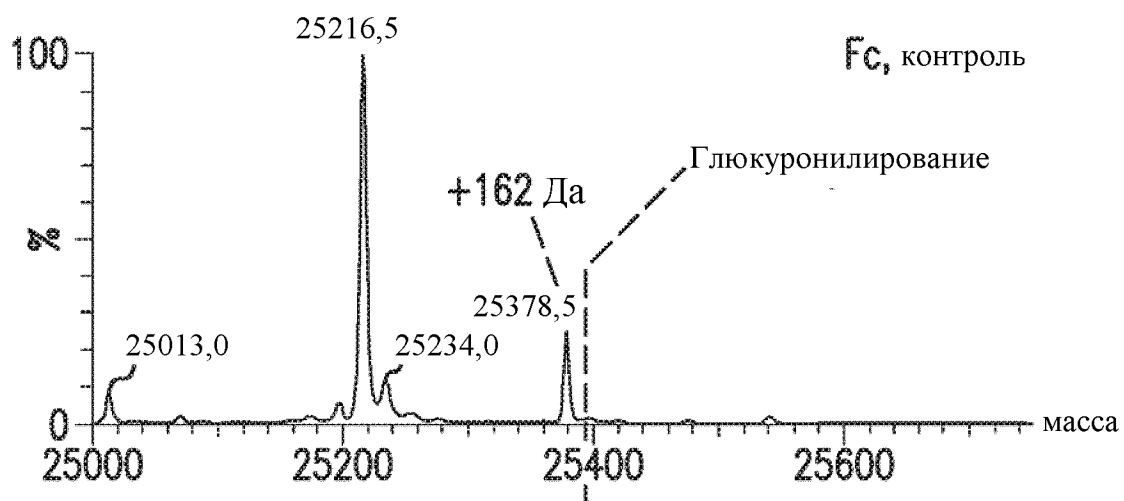




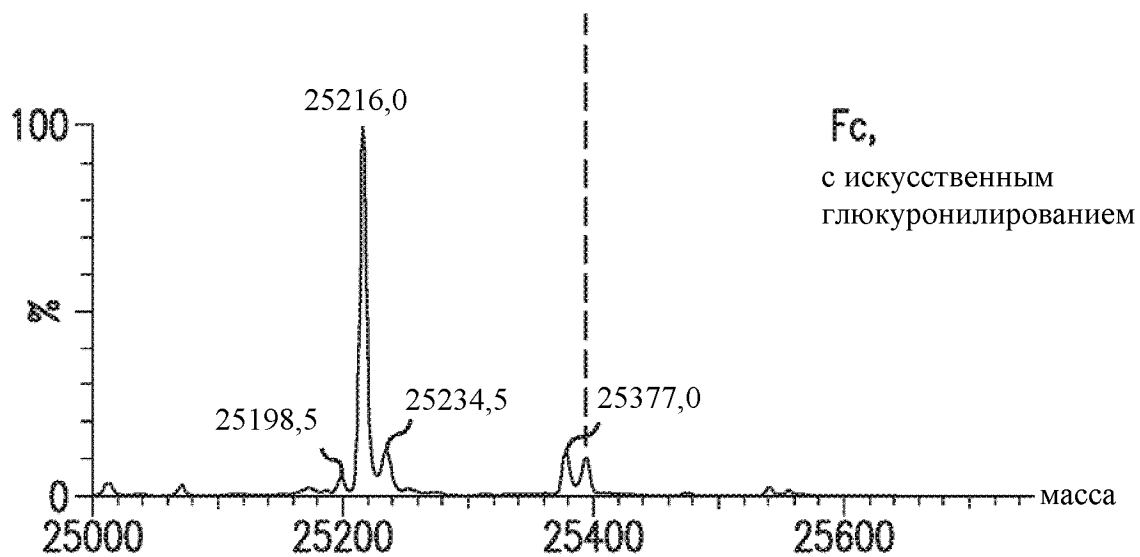
Фиг. 4В



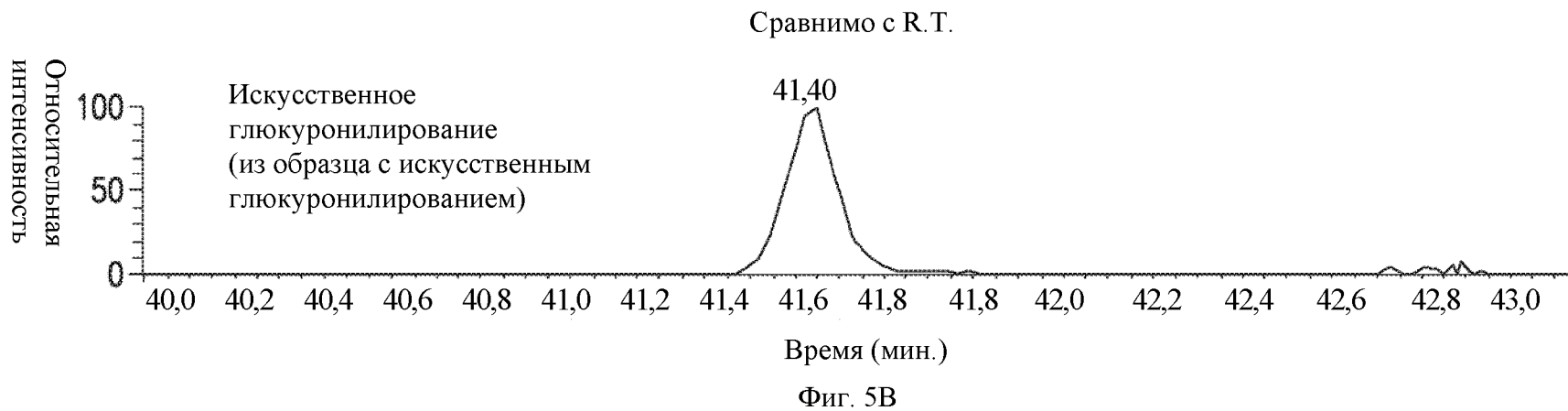
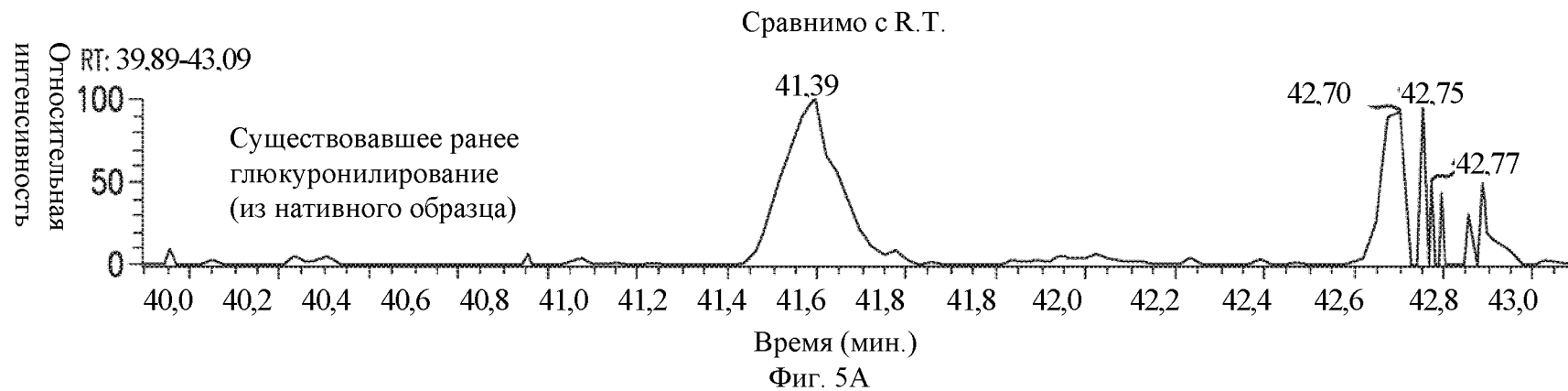
Фиг. 4С



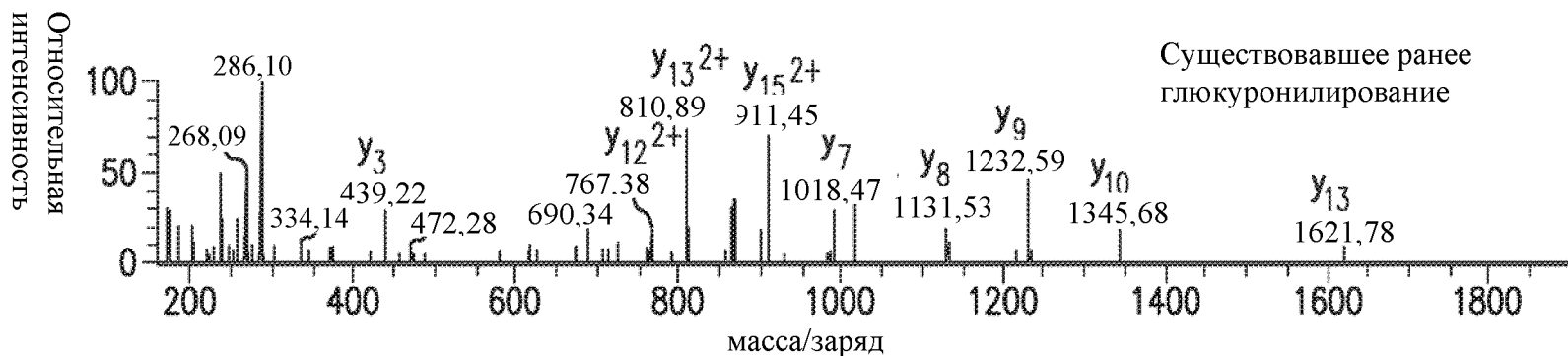
Фиг. 4D



Фиг. 4E

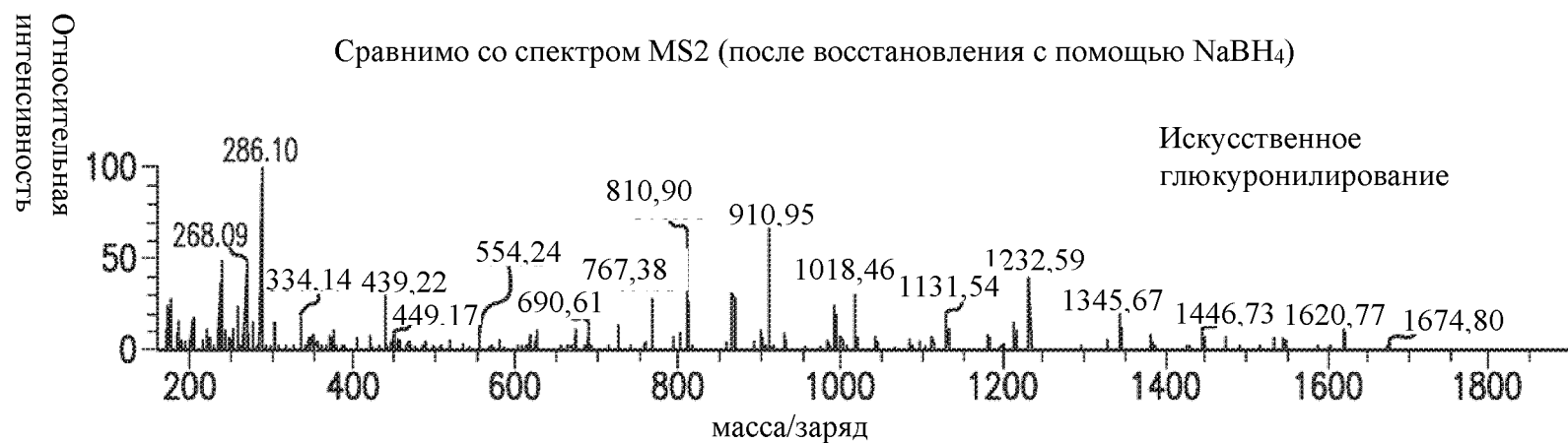


Сравним со спектром MS2 (после восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$ )

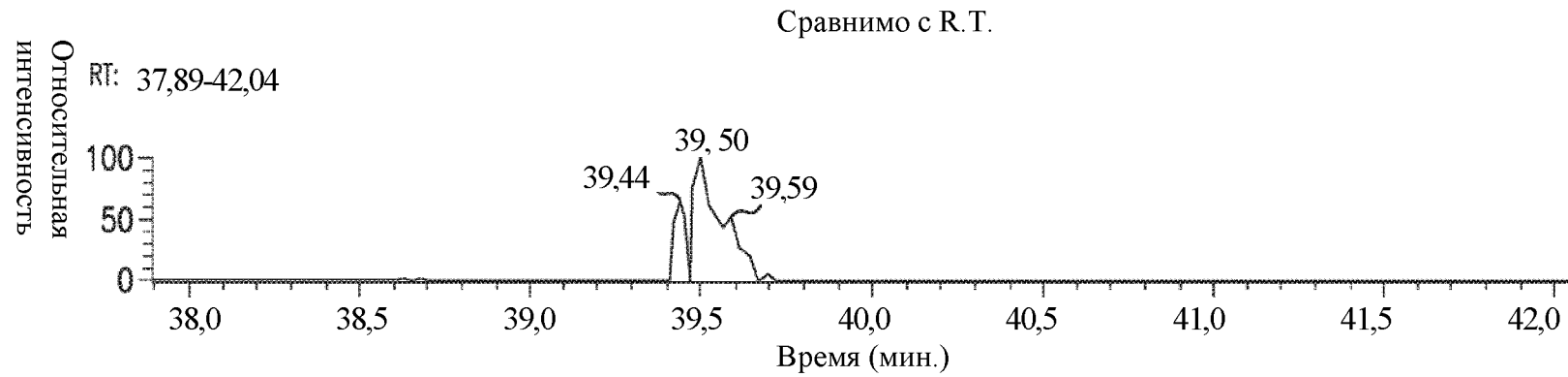


Фиг. 5С

Сравним со спектром MS2 (после восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$ )



Фиг. 5D

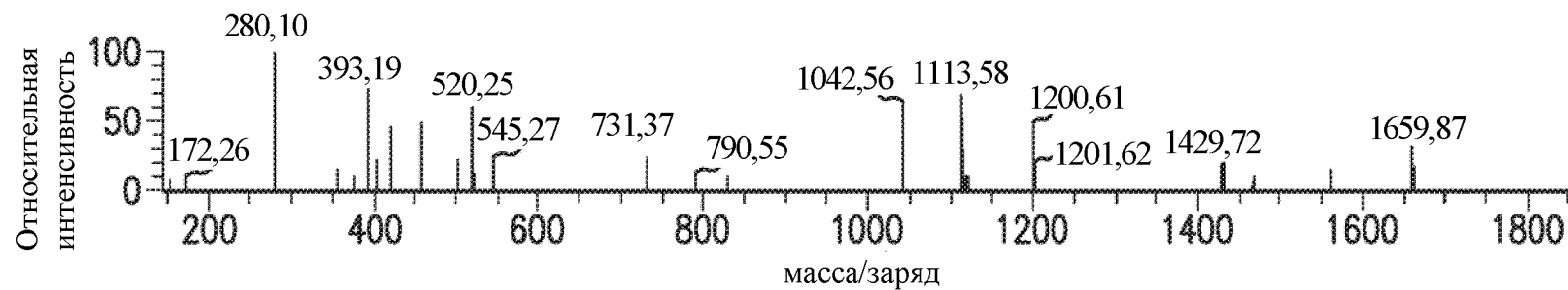


Фиг. 6А



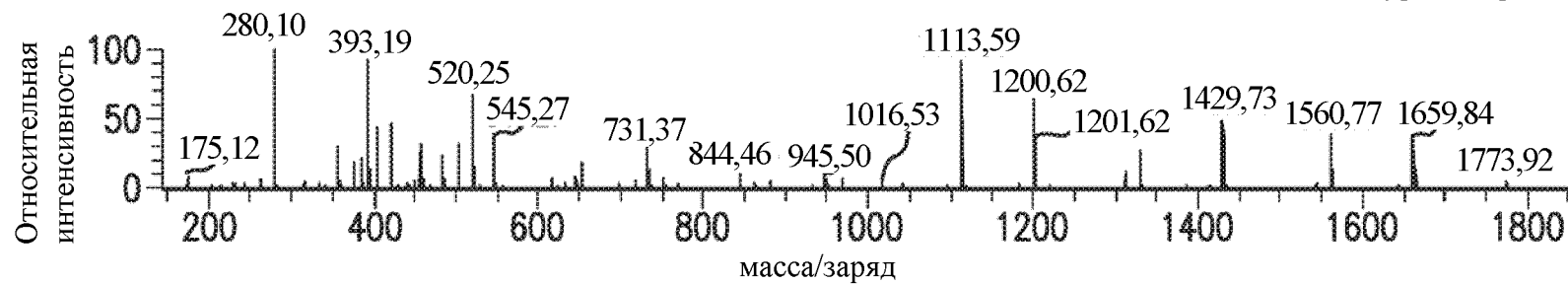
Фиг. 6В

Сравнимо со спектром MS2 (после восстановления с помощью NaBH<sub>4</sub>)



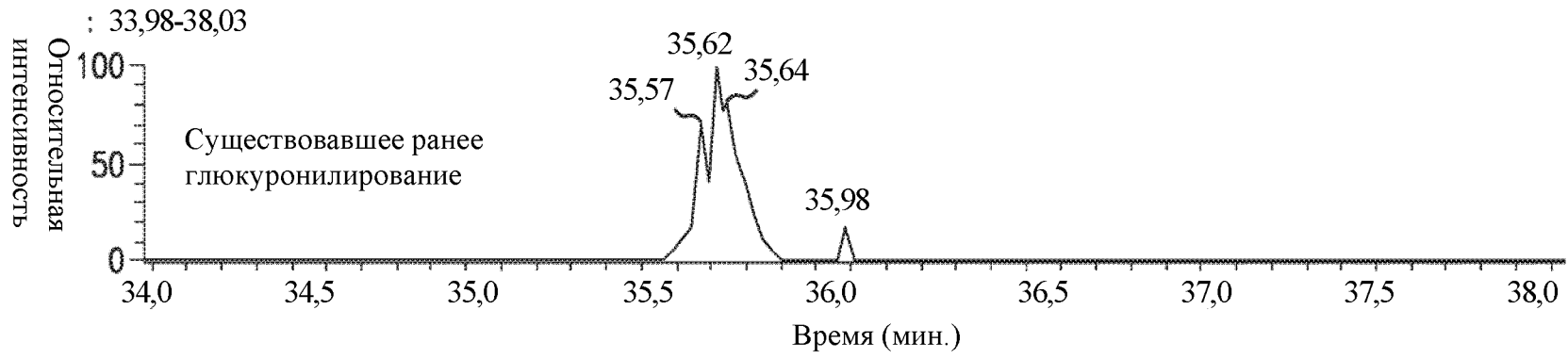
Фиг. 6С

Сравнимо со спектром MS2 (после восстановления с помощью NaBH<sub>4</sub>)

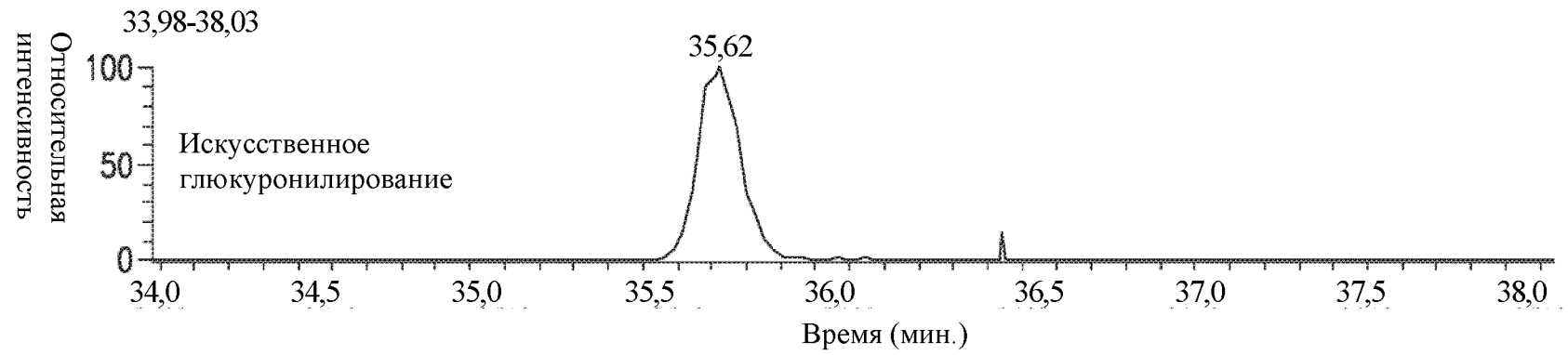


Фиг. 6D

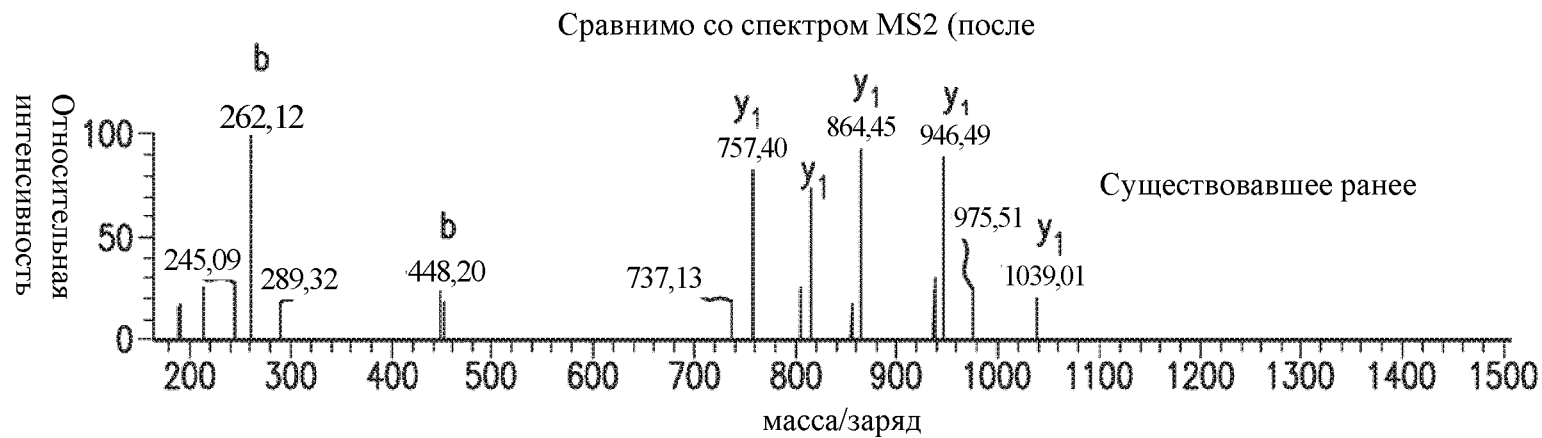
Искусственное  
глюкуронилирование



Фиг. 7А

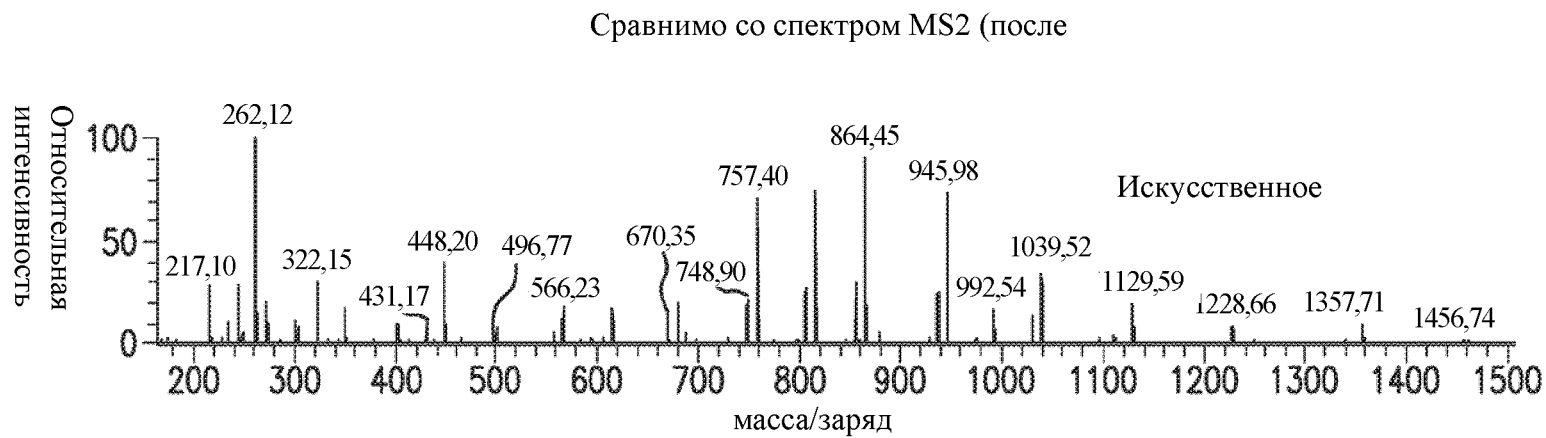


Фиг. 7В



Фиг. 7C

масса/заряд



Фиг. 7D