



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.08.11

(21) Номер заявки
202190276

(22) Дата подачи заявки
2019.08.14

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)
G01N 24/08 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА ИЛИ ПЕПТИДА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/720,607; 62/727,708

(32) 2018.08.21; 2018.09.06

(33) US

(43) 2021.06.04

(86) PCT/US2019/046437

(87) WO 2020/041053 2020.02.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:
**Брэдли Скотт Аллан, Джексон Уэсли
Клинтон Джр., Уайсс Уильям Ф. IV
(US)**

(74) Представитель:
**Парамонова К.В., Угрюмов В.М.,
Христофоров А.А., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Костюшенкова
М.Ю., Лебедев В.В., Строкова О.В.
(RU)**

(56) PRISCILLA KHEDDO ET AL.: "Characterizing monoclonal antibody formulations in arginine glutamate solutions using 1 H NMR spectroscopy", MABS, vol. 8, no. 7, 2 September 2016 (2016-09-02), pages 1245-1258, XP055643123, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2016.1214786 the whole document

NURIA ESTURAU ET AL.: "Optimization of Diffusion-Filtered NMR Experiments for Selective Suppression of Residual Nondeuterated Solvent and Water Signals from 1 H NMR Spectra of Organic Compounds", JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, vol. 71, no. 11, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 4103-4110, XP055643117, US ISSN: 0022-3263, DOI: 10.1021/jo060229i the whole document

LESZEK POPPE ET AL.: "Profiling Formulated Monoclonal Antibodies by 1 H NMR Spectroscopy", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 85, no. 20, 24 September 2013 (2013-09-24), pages 9623-9629, XP055643101, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/ac401867f abstract; pg 9625, left col, second par; pg 9626, left col, second par-pg 9628, right col, first par.

KANG CHEN ET AL.: "Simple NMR methods for evaluating higher order structures of monoclonal antibody therapeutics with quinary structure", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS, vol. 128, 1 September 2016 (2016-09-01), pages 398-407, XP055643098, AMSTERDAM, NL ISSN: 0731-7085, DOI: 10.1016/j.jpba.2016.06.007 pg 4, points 2.2 and 2.4; pg 6, point 3.2.

OLGA B. MOROZOVA ET AL.: "Reduction of Guanosyl Radicals in Reactions with Proteins Studied by TR-CIDNP", APPLIED MAGNETIC RESONANCE, SPRINGER VIENNA, VIENNA, vol. 44, no. 1-2, 12 October 2012 (2012-10-12), pages 233-245, XP035167227, ISSN: 1613-7507, DOI: 10.1007/S00723-012-0403-0 abstract

SANTOSH KUMAR BHARTI ET AL.: "Quantitative 1H NMR spectroscopy", TRAC TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 35, 1 May 2012 (2012-05-01), pages 5-26, XP055167863, ISSN: 0165-9936, DOI: 10.1016/j.trac.2012.02.007 pg 15, left col, first par.

WO-A1-2016179535

SCOTT A. BRADLEY ET AL.: "Measuring Protein Concentration by Diffusion-Filtered Quantitative Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 91, no. 3, 4 January 2019 (2019-01-04), pages 1962-1967, XP055642882, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/acs.analchem.8b04283 the whole document

(57) Способы определения концентрации белка и(или) пептида или молекулярного параметра, такого как коэффициент экстинкции, и их применение.

Данное изобретение относится к способам определения концентрации и(или) специфических молекулярных параметров, таких как коэффициент экстинкции, белка или пептида, и их применению.

Концентрация пептида или белка, например антитела, в растворе является важным свойством для разработки и коммерциализации биологических терапевтических средств, а также во многих других областях исследований. Например, достоверная и точная концентрация требуется для определения эффективности лекарственного средства и объединения данных в единый пакет для представления регулирующим органам.

В настоящее время существует несколько подходов для определения концентрации белка в растворе. Один из таких подходов включает в себя определение специфических молекулярных параметров, таких как коэффициент УФ-экстинкции (ϵ) или дифференциальный инкремент показателя преломления (dn/dc). Другие подходы включают в себя (i) гравиметрический анализ (Nozaki Y., Arch. Biochem. Biophys. 249 (2), 437-446 (1986)), (ii) хромогенные способы (Bradford M. M., Anal. Biochem. 72 (1-2), 248-254 (1976)), (iii) определение азота по Кьельдалю (Jaenicke L., Anal. Biochem. 61 (2), 623-627 (1974)) и (iv) аминокислотный анализ (АКА, англ. "AAA") (Spackman D. H., et al., Anal. Chem. 30 (7): 1190-1206 (1958)). Эти способы, однако, основаны на экспериментально полученных свойствах белка, таких как связывание лиганда, деградация или дериватизация, в отличие от внутренних свойств белка, и могут привести к недостоверным и неточным результатам.

Например, в способе определения коэффициента УФ-экстинкции (ϵ) ϵ прогнозируется на основе эмпирических расчетов; результат, однако, является только оценкой, а не фактическим значением (см., например, Edelhoch H, Biochemistry 6 (7), 1948-1954 (1967)). Более того, в гравиметрическом анализе лиофилизированных белков, например, образец может содержать значительное количество связанной воды, солей и (или) других компонентов композиции, что может привести к неточным расчетам концентрации. Хромогенные способы зависят от состава белка и требуют калибровочных кривых для получения абсолютной концентрации. Проблемы и ограничения также возникают как следствие использования жестких условий при определении концентрации с помощью способа АКА, например, которые могут привести к деградации нескольких ключевых аминокислот на стадиях гидролиза и дериватизации, к большой продолжительности анализа и высокой вариабельности. (Sittampalam G. S., et al, J. Assoc. of Official Anal. Chemists 71 (4), 833-838 (1988)). Все вышеупомянутые проблемы приводят к снижению достоверности и точности при вычислении концентрации и специфических молекулярных параметров белков или пептидов, которые могут влиять на эффективность, возможность разработки и коммерциализации молекулы.

Следовательно, новый точный способ определения абсолютной концентрации белка, который не зависит от структуры белка и компонентов препарата, не полагается на молекулярные взаимодействия или калибровочные кривые для получения абсолютных концентраций, является более достоверным и точным, и позволяет избежать жесткой подготовки образца. Такой способ может быть полезен, например, при определении концентрации белка или пептида в препарате белка или пептида, предназначенном для терапевтического применения.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопия) представляет собой количественную методику, которая используется для измерения концентрации соединений. Однако использование ЯМР-спектроскопии для измерения абсолютных концентраций больших белков в сложных матрицах, таких как терапевтические композиции антител, является одновременно и сложной задачей, и сталкивается с проблемами, аналогичными тем, которые отмечены выше. Например, одна проблема заключается в том, что в спектрах ЯМР преобладают интенсивные пики от различных солей, буферов, поверхностно-активных веществ, регуляторов тоничности и даже воды, присутствующих в терапевтических композициях. Другая такая проблема заключается в том, что структура высокого порядка большинства белков и антител создает уникальные магнитные среды вокруг атомов водорода, которые вызывают большие окна химического сдвига ^1H для данной аминокислоты. Эти проблемы наряду с другими неотъемлемыми проблемами, возникающими при использовании ЯМР (например, изначально более широкая ширина линии для белковых резонансов), приводят к снижению достоверности и точности при вычислении концентрации белков и их специфических молекулярных параметров.

В данном изобретении представлен новый способ количественной спектроскопии ядерного магнитного резонанса для измерения абсолютной концентрации белка или пептида. Спектроскопический способ количественного ЯМР (кЯМР) согласно данному изобретению дает чистые спектры белка или пептида с хорошо разрешенными резонансами, независимо от сложности раствора. Первая стадия представляет собой денатурацию белка (для небольшого пептида этот шаг не является обязательным, но рекомендуется) с целью уменьшения ширины линий резонансов белка, вызванных вторичной, третичной и четвертичной структурой, и обеспечения интеграции. Вторая стадия представляет собой получение спектра кЯМР с помощью диффузионного фильтра для устранения резонансов воды и других компонентов композиции. Наконец, эти данные сравниваются с референсным стандартом для точного определения концентрации. Этот способ в данном документе называется способом А. Концентрация, определенная с помощью способа А, может затем использоваться для определения молекулярного параметра, такого как

коэффициент экстинкции, белка или пептида.

Таким образом, в данном изобретении представлен способ определения концентрации белка в растворе, при этом данный способ включает в себя денатурирование белка, выполнение ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром и расчет концентрации белка с использованием референсного стандарта. В данном изобретении также представлен способ определения концентрации пептида в растворе, при этом данный способ включает в себя выполнение ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром и расчет концентрации пептида с использованием референсного стандарта. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ дополнительно включает в себя денатурирование пептида перед проведением ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром.

В данном изобретении представлен способ получения коэффициента экстинкции белка в растворе, при этом коэффициент экстинкции определяется законом Бера-Ламберта, а концентрация белка, используемая в законе Бера-Ламберта, определяется способом, включающим в себя денатурирование белка, выполнение ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром и расчет концентрации белка с использованием референсного стандарта.

В данном изобретении также представлен способ получения коэффициента экстинкции пептида в растворе, при этом коэффициент экстинкции определяется законом Бера-Ламберта, а концентрация пептида, используемая в законе Бера-Ламберта, определяется способом, включающим в себя необязательную стадию денатурирования пептида, с последующей реализацией стадий выполнения ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром и расчета концентрации пептида с использованием референсного стандарта. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ включает в себя денатурирование пептида перед проведением ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром.

В данном изобретении представлен способ определения концентрации белка при приготовлении лекарственного вещества или лекарственного продукта, при этом указанное вещество содержит белок в растворе, и при этом указанный способ включает в себя получение молекулярного параметра указанного белка. В некоторых вариантах реализации данного изобретения молекулярный параметр представляет собой коэффициент экстинкции, и коэффициент экстинкции определяется законом Бера-Ламберта, а концентрация белка, используемая в законе Бера-Ламберта, определяется способом, включающим в себя денатурирование белка, выполнение ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром и расчет концентрации белка с использованием референсного стандарта.

В данном изобретении представлен способ определения концентрации пептида в препарате лекарственного вещества или лекарственного продукта, при этом указанное вещество содержит пептид в растворе, и при этом указанный способ включает в себя получение молекулярного параметра указанного пептида. В некоторых вариантах реализации данного изобретения молекулярный параметр представляет собой коэффициент экстинкции, и коэффициент экстинкции определяется законом Бера-Ламберта, а концентрация пептида, используемая в законе Бера-Ламберта, определяется способом, включающим в себя необязательное денатурирование пептида, выполнение ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром и расчет концентрации пептида с использованием референсного стандарта. В некоторых вариантах реализации данного изобретения способ включает в себя денатурирование пептида перед проведением ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром.

В данном изобретении дополнительно представлен способ получения молекулярного параметра белка в растворе, при этом способ включает в себя денатурацию белка, выполнение ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром, расчет концентрации белка с использованием референсного стандарта и определение молекулярного параметра белка на основании рассчитанной концентрации. В одном варианте реализации данного изобретения рассчитанная концентрация белка и определенное свойство системы используются в соответствующем уравнении для определения молекулярного параметра белка. В некоторых вариантах реализации данного изобретения молекулярный параметр представляет собой коэффициент экстинкции, а соответствующее уравнение представляет собой закон Бера-Ламберта.

В данном изобретении также представлен способ получения молекулярного параметра пептида в растворе, при этом способ включает в себя необязательное денатурирование пептида, а затем выполнение ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром, расчет концентрации пептида с использованием референсного стандарта и определение молекулярного параметра белка на основании рассчитанной концентрации. В одном варианте реализации данного изобретения рассчитанная концентрация пептида и определенное свойство системы используются в соответствующем уравнении для определения молекулярного параметра пептида. В некоторых вариантах реализации данного изобретения молекулярный параметр представляет собой коэффициент экстинкции, а соответствующее уравнение представляет собой закон Бера-Ламберта.

В данном изобретении представлен способ определения дозы при приготовлении лекарственной субстанции или лекарственного продукта, при этом указанная субстанция содержит белок в растворе, при этом способ включает в себя получение молекулярного параметра белка из контрольной партии, и при этом молекулярный параметр определяется с помощью способа, который включает в себя денатурирование белка, выполнение ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром, расчет концентрации белка с использованием референсного стандарта и определение молекулярного параметра белка на основании

рассчитанной концентрации. В дополнительном варианте реализации данного изобретения способ включает в себя приготовление тестовой партии лекарственной субстанции или лекарственного продукта, при этом указанная концентрация белка в тестовой партии определяется на основании молекулярного параметра. В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения концентрация белка определяется с использованием в соответствующем уравнении молекулярного параметра и соответствующего свойства системы.

В данном изобретении представлен способ определения дозы при приготовлении лекарственной субстанции или лекарственного продукта, при этом указанная субстанция содержит пептид в растворе, при этом способ включает в себя получение молекулярного параметра пептида из контрольной партии, и при этом молекулярный параметр определяется с помощью способа, который включает в себя необязательное денатурирование пептида, выполнение ЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром, расчет концентрации пептида с использованием референсного стандарта и определение молекулярного параметра пептида на основании рассчитанной концентрации. В дополнительном варианте реализации данного изобретения способ включает в себя приготовление тестовой партии лекарственной субстанции или лекарственного продукта, при этом указанная концентрация пептида в тестовой партии определяется по молекулярному параметру. В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения концентрация пептида определяется с использованием в соответствующем уравнении молекулярного параметра и соответствующего свойства системы.

В данном изобретении также представлен способ определения концентрации белка или пептида при приготовлении контрольной партии, при этом контрольная партия содержит белок или пептид в растворе, и при этом способ включает в себя денатурирование белка или, необязательно, денатурирование пептида, выполнение кЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром, расчет концентрации белка или пептида с использованием референсного стандарта и референсной методики, и определение молекулярного параметра белка или пептида на основании рассчитанной концентрации. В другом варианте реализации данного изобретения способ дополнительно включает в себя определение концентрации белка или пептида в препарате из тестовой партии, при этом указанная концентрация пептида или белка в тестовой партии определяется на основании молекулярного параметра.

В данном изобретении представлены варианты реализации, которые применимы к способам, описанным в данном документе. Один из таких вариантов реализации данного изобретения включает в себя способ, в котором белок или пептид денатурируют с помощью хаотропного агента. В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения хаотропный агент представляет собой мочевины- d_4 . В других таких вариантах реализации данного изобретения хаотропный агент представляет собой гуанидиния хлорид- d_6 . В некоторых вариантах реализации данного изобретения референсный стандарт представляет собой внутренний референсный стандарт. В предпочтительных вариантах реализации данного изобретения референсный стандарт представляет собой внешний референсный стандарт. В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения внешний референсный стандарт представляет собой низкомолекулярный первичный стандарт. В конкретном варианте реализации данного изобретения внешний референсный стандарт представляет собой малеиновую кислоту. В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения внешняя референсная методика представляет собой PULCON. В некоторых вариантах реализации данного изобретения белок представляет собой антитело. В некоторых таких вариантах реализации данного изобретения антитело представляет собой моноклональное антитело. В других таких вариантах реализации данного изобретения антитело представляет собой биспецифическое антитело. В некоторых вариантах реализации данного изобретения раствор, содержащий измеряемый белок или пептид, содержит D_2O .

Данное изобретение также предполагает использование способа А или молекулярного параметра, определенного на основании концентрации, полученной в способе А, во множестве применений. Такие применения включают в себя определение токсичности, определение клинической и (или) коммерческой дозы лекарственного препарата, способ определения корпоративных или первичных референсных стандартов, способ определения концентрации белка или пептида во время производственного процесса, способ аликвотирования белка или пептида, способ аликвотирования белка или пептида, при котором концентрация аликвотированного белка или пептида аналогична желаемой концентрации, способ, включающий в себя испытание при выпуске партии, или способ составления композиции лекарственной субстанции или лекарственного продукта.

Данное изобретение предполагает, что способ А может быть использован для описанных в данном документе целей, относящихся к любому белку или пептиду, например, к белкам или пептидам в областях терапевтических средств или нефтяной промышленности. В качестве примера (не предназначенного для ограничения), способ А может быть реализован в применениях, относящихся к любому или ко всем из следующих, включая любые их биомиметики, причем белок или пептид является активным ингредиентом в следующих, или в любых биомиметиках из следующих: дулаглутид (продается в некоторых странах под названием Trulicity®), иксекизумаб (продается в некоторых странах под названием Taltz®), рамуцирумаб (продается в некоторых странах под названием Cytamza®), цетуксимаб (продается в неко-

торых странах под название Erbitux®), оларатумаб (продается в некоторых странах под названием Lagtruvo®), нецитумаб (продается в некоторых странах под названием Portrazza®), антитела против CGRP, такие как галканезумаб (также известный как LY2951742), антитела против ИЛ-23, такие как микизумаб (также известный как LY3074828), соланезумаб (также известный как LY2062430), танезумаб, антитела против N3pG-Aβ, антитела против белка тау, антитела против Aβ42, биспецифические антитела против BAFF/ИЛ-17, антитела против CSF-1R, антитела против CXCR1/2, антитела против ИЛ-21, биспецифические антитела против ИЛ-23/CGRP, антитела против ИЛ-33, антитела против PD-L1 и антитела против TIM-3.

Данное изобретение также предполагает, что способ А: (i) подходит для использования в качестве основы для измерения других внутренних параметров белка или пептида, или для преобразования любого из нынешних способов определения относительной концентрации в способ определения абсолютной концентрации, (ii) может быть использован для количественного определения пептидов, в которых отсутствуют хромофорные аминокислоты и которые трудно мониторировать с помощью ультрафиолета, (iii) позволяет проводить более простую, быструю и безопасную подготовку образцов и сбор данных, чем текущий способ ААА, (iv) обеспечивает линейность, достоверность и точность полученных концентраций, которые подходят для различных белков и композиций, и (v) может быть использован для количественного определения других типов макромолекул (например, полимеров, поверхностно-активных веществ и т.д.) в присутствии низкомолекулярных примесей.

Данное изобретение предполагает, что способы, описанные в данном документе, могут использоваться математические уравнения, также описанные в данном документе. Например, концентрация белка, c_p , в граммах на литр может быть рассчитана из спектра кЯМР с помощью следующего уравнения

$$c_p = c_s \frac{A_p H_s}{A_s H_p} f_{DF} f_{ER} f_{DIL} f_U \quad (\text{Ур. 1}).$$

В данном документе в качестве примера приведено подробное описание этого уравнения.

Рядовой специалист в данной области техники поймет, что, хотя в данном документе приведены примеры конкретного программного обеспечения, для получения сопоставимых результатов можно использовать другие программы.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Последовательность импульсов bppste для спектрометров Agilent (также известная как Dbppste) и определение различных задержек.

Фиг. 2. Спектры ^1H ЯМР для стандартизированного моноклонального антитела из NIST - Национального института стандартов и технологий США (NIST мАт). Спектр ЯМР ^1H для мАт NIST (А) в нативной форме со стандартной одноимпульсной последовательностью, (В) то же, что и А, с вертикальным масштабом 5000х, (С) в нативной форме с диффузионным фильтром и (D) в денатурированной форме с диффузионным фильтром. Пики, отмеченные звездочкой, получены от гистидинового буфера. Число сканирований составило 1024 для А - С и 64 для D.

Фиг. 3. D-измерения для NIST мАт. Фиг. 3а: спектры ЯМР для стандартизированного денатурированного мАт, полученные с последовательностью импульсов bppste. Вставка: разложение пика для резонансов I/L/V. Вставка: увеличенное изображение указанной области. Фиг. 3б, слева: чистые спектры ЯМР для различных диффундирующих частиц, определенные с помощью алгоритма DECRA. Фиг. 3б, справа: график Стейскала - Таннера и коэффициенты диффузии из алгоритма DECRA.

Фиг. 4. Измерения T_1 и T_2 для NIST мАт. Фиг. 4а: репрезентативные данные измерений T_1 и T_2 с использованием последовательности импульсов bppste. Слева: спектры ЯМР и параметры настройки последовательности импульсов bppste для измерения T_1 . Справа: спектры ЯМР и параметры настройки последовательности импульсов bppste для измерения T_2 . Фиг. 4б: график для расчетов T_1 и T_2 .

Фиг. 5. Спектры кЯМР с диффузионным фильтром (кЯМР-ДФ, англ. "DF-qNMR") для 14 образцов денатурированного БСА (бычьего сывороточного альбумина) из NIST (NIST БСА, англ. "NIST BSA"). Вставка: увеличенное изображение указанной области.

Фиг. 6. Концентрации образцов NIST БСА: способ А в сравнении с гравиметрическим измерением.

Фиг. 7. Частичный удельный объем NIST БСА: плотность образца в зависимости от концентрации БСА.

Фиг. 8. Спектры кЯМР-ДФ для 14 образцов денатурированного биспецифического антитела. Спектры кЯМР-ДФ для 14 образцов денатурированного биспецифического антитела. Пик остаточной воды отмечен звездочкой. Вставка: увеличенное изображение указанной области.

Фиг. 9. Концентрации образцов биспецифического антитела: способ А в сравнении с гравиметрическим измерением.

Определения

Термин "спектроскопия ядерного магнитного резонанса" (также называемая "ЯМР-спектроскопия"), при использовании в контексте данного документа, относится к спектроскопической методике, известной рядовому специалисту в данной области техники, в которой спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) могут использоваться для изучения структуры органических молекул. Термин

"количественная спектроскопия ядерного магнитного резонанса" (также называемая "кЯМР-спектроскопия"), при использовании в контексте данного документа, относится к получению количественной информации о чистоте или концентрации образца из одного или нескольких спектров ЯМР. Такие спектры называются в данном документе спектрами количественного ядерного магнитного резонанса (спектрами кЯМР). ЯМР-спектроскопия может включать в себя использование "диффузионного фильтра", который может быть использован для избирательного ослабления сигнала от более мелких молекул в смеси в зависимости от их размера (см., например, Stilbs P., Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 19 (1): 1-45 (1987)). Чтобы сбалансировать затухание пиков матрицы и пиков белка, сила диффузионного фильтра может быть определена рядовым специалистом в данной области техники на основании контекста каждого эксперимента. Например, если баланс слишком слабый, то диффузионный фильтр имеет ограниченное значение. Если баланс слишком сильный, то диффузионный фильтр начинает подавлять белковые сигналы, что снижает отношение сигнал - шум измерения. Это снижение может привести к увеличению времени эксперимента. В качестве другого примера, если один из компонентов матрицы не удален полностью, и он представляет собой интерферирующий пик, то в таком случае он будет вносить вклад в площадь пика белка, и его необходимо вычистить, чтобы получить наиболее точные результаты. Это можно сделать путем приготовления холостого образца, содержащего матрицу без белка, пропускания холостого образца с диффузионным фильтром, определения площади оставшегося пика матрицы и вычитания этого числа из площади, полученной для образца белка.

Термин "референсный стандарт", при использовании в контексте данного документа, относится к соединению, спектр ^1H -ЯМР которого обеспечивает по меньшей мере один отличительный пик, представляющий известное количество протонов, и чистота и концентрация которого известны с высокой степенью достоверности. Референсный стандарт может быть внутренним референсным стандартом, при этом референсный стандарт присутствует в растворе, содержащем представляющий интерес белок или пептид, или референсный стандарт может быть внешним, при этом референсный стандарт отделен от раствора, содержащего представляющий интерес белок или пептид. Референсный стандарт может быть низкомолекулярным первичным референсным стандартом, представляющим собой материал, который не калиброван по другому стандарту, а вместо этого определяется такими качествами, как его масса. Сертифицированные низкомолекулярные референсные образцы, обычно используемые в качестве внутренних стандартов ^1H кЯМР, легко доступны и могут также использоваться в качестве внешних стандартов [см., например, Rigger et al., M. I AOAC International, 2017, 100, 1365-1375].

Референсная методика представляет собой математический алгоритм, использующий данные референсного стандарта. Например, внешняя референсная методика представляет собой математический алгоритм, использующий данные внешнего референсного стандарта. Одним из примеров таковой является методика определения концентрации по длительности импульса (методика PULCON) (Wider G. and Dreier L. I, Am. Chem. Soc. 128 (8), 2571 - 2576 (2006)).

Термин "спектры кЯМР-ДФ", при использовании в контексте данного документа, относится к спектрам ЯМР, к которым был применен диффузионный фильтр и из которых может быть получена количественная информация о чистоте или концентрации представляющего интерес белка или пептида при сравнении с референсным стандартом.

Термин "молекулярный параметр", при использовании в контексте данного документа, означает скалярное значение, которое относится к тому, как некоторые свойства системы (например, оптическая плотность, физическая плотность, показатель преломления) изменяются в ответ на изменения других свойств системы (например, температуры, давления или композиции). Уравнение ("соответствующее уравнение"), используемое для определения молекулярного параметра, может варьировать в зависимости от того, какое свойство или свойства системы известны. Молекулярный параметр относится к внутреннему свойству белка или пептида.

Например, коэффициент экстинкции (ϵ) представляет собой молекулярный параметр, который описывает, как оптическая плотность раствора изменяется в ответ на изменения концентрации поглощающих частиц и длины пути, по которому проходит свет. Коэффициент экстинкции белка или пептида [мл/(мг·см)] можно определить с помощью комбинации спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой (УФ-видимой) области спектра и способа А следующим образом: $A = \epsilon c l$ (Закон Бера-Ламберта), где А представляет собой оптическую плотность раствора белка или пептида, l представляет собой длину пути [см], а с представляет собой абсолютную концентрацию белка или пептида [мг/мл]. В качестве другого примера, кажущийся парциальный удельный объем (\bar{V}) [мл/г] белка или пептида можно определить с помощью комбинации денситометрии и способа А следующим образом:

$$\rho = \rho_0 + (1 - \bar{v}\rho_0)(c/1000)$$

где ρ представляет собой физическую плотность раствора белка или пептида [г/мл], ρ_0 представляет собой физическую плотность матрицы раствора белка или пептида [г/мл], и c представляет собой абсолютную концентрацию белка или пептида [мг/мл]. В качестве третьего примера, (дифференциальный) инкремент показателя преломления (dn/dc) белка или пептида [мл/мг] можно определить с помощью комбинации (дифференциальной) рефрактометрии и способа А следующим образом:

$$n = n_0 + (dn/dc)c$$

где n представляет собой показатель преломления раствора белка или пептида, n_0 представляет собой показатель преломления матрицы раствора белка или пептида, и c представляет собой абсолютную концентрацию белка или пептида [мг/мл].

Рядовой специалист в данной области техники может определить представляющий интерес молекулярный параметр с помощью линейной регрессии нескольких измерений оптической плотности/физической плотности/показателя преломления как функции концентрации (концентрации, определенной по способу А). Молекулярный параметр, такой как коэффициент экстинкции, может использоваться для определения концентрации лекарственного средства путем измерения соответствующего свойства системы, такого как оптическая плотность в УФ-спектре, и решения соответствующего уравнения, которое коррелирует их (например, закон Бера-Ламберта).

Общая структура "моноклонального антитела" известна. Антитело IgG представляет собой гетеротетрамер из четырех полипептидных цепей (двух идентичных "тяжелых" цепей и двух идентичных "легких" цепей), которые поперечно сшиты посредством внутри- и межцепочечных дисульфидных связей. Варибельные области каждой пары тяжелая цепь - легкая цепь ассоциируют с образованием сайтов связывания. Варибельная область тяжелой цепи (V_H) и варибельная область легкой цепи (V_L) могут быть подразделены на области гиперварибельности, называемые областями, определяющими комплементарность (англ. "CDR"), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (англ. "FR"). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Области CDR содержат большинство остатков, которые обеспечивают специфические взаимодействия с антигеном.

Термин "биспецифическое антитело", при использовании в контексте данного документа, относится к конструкции бивалентного антитела, которая включает в себя, но не ограничивается ими, формат IgG-оцFv (как указано в PCT/US2015/058719) и форматы бивалентного IgG (как описано в US 2018/0009908). Данное изобретение также предполагает, что любой сконструированный человеком белок или антитело, независимо от третичной или четвертичной структуры, также можно использовать в способах, описанных в данном документе. Примеры таких сконструированных человеком белков или антител включают в себя триспецифические или тетраспецифические антитела и слитые белки.

В контексте данного документа пептид содержит полимерную цепь из аминокислот. Эти аминокислоты могут быть природными или синтетическими аминокислотами, включительно с модифицированными аминокислотами. Пептиды могут иметь менее выраженную вторичную и третичную структуру, но склонны к агрегированию в растворе; следовательно, пептид также может быть денатурирован с помощью хаотропного агента. Денатурация пептида может привести к увеличению соотношения сигнал - шум в ЯМР-спектроскопии, облегчая тем самым интеграцию. Денатурация пептида также может позволить исследовать более концентрированные образцы, что сокращает время эксперимента. Для целей способов, описанных в данном документе, определение концентрации пептида может быть более точным, если пептид денатурирован. Для денатурирования с помощью хаотропного агента предпочтительный хаотропный агент будет зависеть от конкретных требований каждого пептида и может быть определен экспериментально специалистом в данной области техники.

Рядовой специалист в данной области техники понимает, что белок содержит одну или несколько полимерных пептидных цепей из аминокислот. Эти аминокислоты могут быть природными или синтетическими аминокислотами, включительно с модифицированными аминокислотами. Белок может представлять собой рекомбинантный белок. Первичная структура белка состоит из его линейной последовательности субъединиц мономерных аминокислот. Вторичная структура белка содержит структуру водородных связей, дающую начало трехмерным структурным особенностям локальных сегментов аминокислотной цепи, таких как α -спирали и β -листы. Третичная структура белка описывает общую форму белка, определяемую трехмерными координатами атомов. Четвертичная структура относится к расположению двух или более белковых субъединиц в комплексе. Белок может быть "денатурирован", когда на раствор, содержащий белок, воздействует внешний стресс или хаотропный агент, и белок становится развернутым. Таким образом, денатурированный белок теряет большинство своих вторичных, третичных и четвертичных структурных особенностей. Примеры хаотропных агентов включают в себя мочевины-d₄ и гуанидиния хлорид-d₆.

Кроме того, термин "раствор", при использовании в контексте данного документа, относится к пептиду или белку в созданной человеком водной смеси, которая содержит компоненты помимо воды. Термин "партия" относится к определенному количеству лекарственного средства или другого материала, представляющего собой белок или пептид, и должна иметь однородные характеристики и качество в определенных пределах, и производится в соответствии с одним производственным заказом в течение одного и того же цикла производства. Термин "серия" относится к партии или определенной идентифицированной части партии, имеющей однородные характеристики и качество в определенных пределах; или, в случае лекарственного препарата, производимого непрерывным способом, серия представляет собой

определенное идентифицированное количество, произведенное за единицу времени или на единицу количества таким образом, чтобы гарантировать его однородные характеристики и качество в определенных пределах. Термин "контрольная партия" относится к установленному и соответствующим образом охарактеризованному внутреннему референсному материалу, при этом указанный материал содержит белок или пептид, и при этом указанный материал приготовлен из серии (серий), репрезентативной (репрезентативных) для производственных и клинических материалов. Способ А используется для определения концентрации и молекулярных параметров, таких как коэффициент экстинкции, белка или пептида в растворе в контрольной партии. Молекулярный параметр, такой как коэффициент экстинкции, полученный из контрольной партии, затем используется для определения концентрации белка или пептида в последующей серии (которая в данном документе именуется "тестовая партия").

Термин "лекарственный продукт", при использовании в контексте данного документа, означает готовую дозированную лекарственную форму, например, таблетку, капсулу или раствор, которая (которые) содержит лекарственную субстанцию, как правило, но не обязательно, в сочетании с одним или несколькими другими ингредиентами. "Лекарственная субстанция" представляет собой активный ингредиент, который предназначен для обеспечения фармакологической активности или другого прямого эффекта при диагностике, санации, облегчении, лечении или профилактике заболевания, или для воздействия на структуру или любую функцию организма человека, но не содержит промежуточных соединений, используемых в синтезе такого ингредиента. При использовании в контексте данного документа, лекарственная субстанция содержит белок или пептид. Способ А может использоваться для различных целей, связанных с лекарственным продуктом или лекарственной субстанцией, содержащей белок или пептид, например, в процессе производства лекарственного продукта или лекарственной субстанции.

Термин "доза" относится к количеству белка или пептида в матрице, которое вызовет желаемый биологический или медицинский ответ. Субстанция может быть лиофилизированной или находиться в водном растворе. Для приготовления субстанции, предназначенной для терапевтического применения, специалист в данной области техники понимает, что требуется достоверная и точная концентрация белка или пептида. Способы, описанные в данном документе, предоставляют новые средства получения концентрации белка или пептида путем определения коэффициента экстинкции или другого молекулярного параметра белка или пептида в контрольной партии и последующего использования этого коэффициента экстинкции или другого молекулярного параметра для определения концентрации белка или пептида в последующих тестовых партиях.

Аликвотирование означает удаление части большего объема из одного сосуда и добавление его в отдельный сосуд. Сосудом может быть любой предмет, такой как контейнер, флакон, колба, или устройство, которое подходит для хранения белка или пептида в лиофилизированной форме или в растворе.

Испытание при выпуске серии относится к соответствующему лабораторному определению удовлетворительного соответствия окончательным спецификациям для лекарственного препарата (содержащего белок или пептид), включая силу (концентрацию) каждого активного ингредиента, перед выпуском (выпуском производителем лекарственного препарата на рынок). Испытание при выпуске серии может быть, например, УФ-исследованием при выпуске серии. Концентрация белка или пептида может быть определена на основании коэффициента экстинкции белка или пептида, при этом коэффициент экстинкции определяется с помощью способа А в контрольной партии.

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют данное изобретение и предоставляют типичные способы и процедуры для выполнения различных конкретных вариантов реализации данного изобретения. Тем не менее, следует понимать, что приведенные ниже примеры представлены с целью иллюстрации, но не ограничения, и что специалисты в данной области техники могут осуществлять различные модификации.

Примеры

Подготовка образцов.

Референсный стандарт: любое соединение со спектром ^1H -ЯМР, который обеспечивает по крайней мере один характерный пик, репрезентативный для известного количества протонов, известной чистоты и концентрации с высокой степенью достоверности, обладающее химической и физической стабильностью в растворе, может использоваться для обеспечения расчета абсолютной концентрации по спектрам ДФ-кЯМР. Например, малеиновая кислота может использоваться в качестве внешнего референсного стандарта для количественного определения. Чтобы приготовить малеиновую кислоту в качестве внешнего референсного стандарта, сертифицированную малеиновую кислоту (11,183 мг, 0,096347 ммоль) помещают в мерную колбу на 5 мл и растворяют в D_2O . Аликвоту переносят в пробирку, такую как пробирка для ЯМР "Wilmad 435 precision 4 mm NMR tube", таким образом, чтобы высота образца составляла 40 мм.

Образцы белков: гуанидиния хлорид- d_6 (0,6 г, 6 ммоль) помещают в мерную колбу на 1 мл. Колбу помещают на весы и добавляют 400 мкл раствора белка. Затем раствор осторожно обрабатывают ультразвуком и перемешивают вихревым способом до растворения всех твердых частиц. Добавляют D_2O для достижения конечного объема. Аликвоту переносят в пробирку, такую как пробирка для ЯМР "Wilmad 435 precision 4 mm NMR tube", таким образом, чтобы высота образца составляла 40 мм.

Образцы пептидов: мочевины-d₄ (0,13 г, 2 ммоль) помещают в мерную колбу на 1 мл. Колбу помещают на весы и добавляют ~1 мл раствора белка. Затем раствор осторожно обрабатывают ультразвуком и перемешивают вихревым способом до растворения всех твердых частиц. Добавляют D₂O для достижения конечного объема. Аликвоту переносят в пробирку, такую как пробирка для ЯМР "Wilmad 435 precision 4 mm NMR tube", таким образом, чтобы высота образца составляла 40 мм.

Расчеты.

Концентрация белка, c_p , в граммах на литр рассчитывается на основании спектра ДФ-кЯМР по следующему уравнению:

$$c_p = c_s \frac{A_p H_s}{A_s H_p} f_{DF} f_{ER} f_{DIL} f_U \quad (\text{Ур. 1})$$

где c_s - концентрация референсного стандарта, A_p - площадь выбранного пика белка в спектре ДФ-кЯМР (обычно это площадь металлических групп валина, изолейцина и лейцина в диапазоне 1,0-1,4 ppm (частей на миллион), но может быть любой пик с достаточным разрешением), H_s - число протонов, вносящих вклад в пик референсного стандарта, A_s - площадь пика референсного стандарта, H_p - число протонов, вносящих вклад в пик белка, а различные f представляют собой функции, которые зависят от конкретных экспериментальных условий. Параметр f_{DF} учитывает ослабление площади пика белка из-за диффузионного фильтра и получен из уравнения Стейскала-Таннера (Johnson, C. S. et al., Concepts in Magnetic Resonance Part A 2012, 40A, 39-65). Для импульсной последовательности bppste (Pelta, M. D et al., Magn. Reson. Chem. 1998, 36, 706-714), используемой в данной документе, данный параметр задается следующим уравнением:

$$f_{DF} = 2 e^{\frac{\tau_1}{T_1}} e^{\frac{\tau_2}{T_2}} e^{D \gamma^2 g^2 \delta^2 [\Delta - \frac{\delta}{2} - \frac{\tau_3}{2}]} \quad (\text{Ур. 2})$$

где γ - гиромагнитное соотношение для ¹H, g - напряженность градиента импульсного поля, δ - длительность градиента импульсного поля, Δ - диффузионная задержка, T_1 - время спин-решеточной ядерной релаксации для интересующих протонов белка, T_2 - время спин-спиновой ядерной релаксации для интересующих протонов белка, D - коэффициент трансляционной диффузии белка, τ_1 - время между вторым и третьим 90-градусными импульсами в последовательности импульсов bppste (см. фиг. 1), τ_2 - общее время между первым и вторым 90-градусными импульсами (и между третьим 90-градусным импульсом и захватом) и τ_3 - общее время между импульсами градиента импульсного поля пар биполярных импульсов. Для последовательности импульсов, которая обеспечивается приборами Agilent, эти показатели определяются следующими параметрами прибора:

$$\tau_1 = \Delta - \delta - 2t_{gs} - 4\theta_p - 2t_{rg} \quad (\text{Ур. 3})$$

$$\tau_2 = 2(\delta + 2t_{gs} + 2\theta_p + 2t_{rg}) \quad (\text{Ур. 4})$$

$$\tau_3 = t_{gs} + 2\theta_p + t_{rg} \quad (\text{Ур. 5})$$

где t_{gs} - стабилизационная задержка градиента, t_{rg} - длительность стробирующего импульса приемника, предшествующего импульсу, и θ - ширина 90-градусного импульса. Для других последовательностей диффузионных импульсов выражение для f_{DF} будет другим. Переменная f_{ER} содержит параметры прибора, необходимые для внешнего реферирования. В наиболее простом виде:

$$f_{ER} = \frac{S_s G_s}{S_p G_p} \quad (\text{Ур. 6})$$

где S и G - число сканирований и коэффициент усиления приемника, соответственно, используемые для сбора индивидуальных спектров ЯМР белка и референсного стандарта. При использовании методики PULCON, данная переменная принимает следующий вид:

$$f_{ER} = \frac{T_p \theta_p S_s G_s}{T_s \theta_s S_p G_p} \quad (\text{Ур. 7})$$

где T - температура образца во время захвата спектров ЯМР. f_{DIL} учитывает разбавление исходного образца белка до конечного образца ЯМР. Если конечный объем получен волюметрическим способом, а аликвота исходного образца - гравиметрическим способом, то этот коэффициент определяется так:

$$f_{DIL} = \frac{vol_F}{wt_I} d_I \quad (\text{Ур. 8})$$

где vol_F - объем конечного раствора (т.е. раствора образца ЯМР), а wt_I и d_I - масса и физическая плотность аликвоты исходного раствора белка. В качестве альтернативы, если разбавление выполняется путем гравиметрического добавления как исходного раствора белка, так и D₂O, тогда:

$$f_{DIL} = 1 + \frac{wt_{D2O} \cdot d_I}{d_{D2O} \cdot wt_I} \quad (\text{Ур. 9})$$

где wt_{D2O} и d_{D2O} - масса и физическая плотность D₂O. Наконец, f_U преобразует единицы концентрации референсного стандарта для количественного определения, обычно миллимолярного, в типичные

единицы - граммы на литр (или, что эквивалентно, миллиграммы на миллилитр). В этом случае:

$$f_U = \frac{M_p}{1000} \quad (\text{Ур. 10})$$

где M_p - молекулярная масса белка.

Первый экспоненциальный член в уравнении 2 описывает затухание сигнала вследствие ядерной релаксации T_1 , второй - вследствие ядерной релаксации T_2 , а третий - вследствие молекулярной диффузии. Из всех членов указанного уравнения эти три величины (T_1 , T_2 и D) являются единственными неизвестными; все остальные величины представляют собой параметры последовательности импульсов/параметры прибора или физическую константу (γ). T_1 , T_2 и D зависят от состояния молекулы и условий раствора, и должны измеряться для каждого уникального образца. Это можно сделать с помощью трех отдельных экспериментов, используя ту же последовательность импульсов, что и в диффузионном фильтре. Измерение D представляет собой хорошо известный эксперимент, в котором получают множественные спектры с увеличением силы градиента (Stejskal, E. O. and Tanner, J. E., J. Chem. Phys., 1965, 42, 288-292). Это сохраняет члены T_1 и T_2 в уравнении 2 постоянными, делая затухание сигнала обусловленным исключительно параметром D . Затем вычисляется D с применением подходящего алгоритма, такого как DECRA (Windig, W.; Antalek, B. Chemom. Intell. Lab. Syst., 1997, 37, 241-254). Для измерения T_1 с помощью последовательности импульсов Agilent bppste получают несколько спектров с использованием комбинаций диффузионной задержки и силы градиента (gzlv11), таким образом, что:

$$gzlv11_n = gzlv11_1 \times \sqrt{\frac{\Delta'_1}{\Delta'_n}} \quad (\text{Ур. 11}),$$

где Δ' - актуальная диффузионная задержка, определяемая следующим образом:

$$\Delta' = \Delta - \frac{\delta}{3} - \frac{\tau_3}{2} \quad (\text{Ур. 12}).$$

Это сохраняет члены T_2 и D уравнения 2 постоянными, делая затухание сигнала обусловленным исключительно релаксацией T_1 . Эффективное значение T_1 для протонов выбранного пика белка затем рассчитывается на основе моноэкспоненциального соответствия A_p против τ_1 .

Для измерения T_2 с помощью последовательности импульсов Agilent bppste, получают несколько спектров с использованием комбинаций стабилизационной задержки градиента, диффузионной задержки и силы градиента, таким образом, что:

$$\Delta_n = \Delta_1 + (\tau_{rg,n} - \tau_{rg,1}) \quad (\text{Ур. 13}),$$

а $gzlv11_n$ определяется так, как показано выше. Это сохраняет члены T_1 и D указанного уравнения постоянными, делая затухание сигнала обусловленным исключительно релаксацией T_2 . Эффективное значение T_2 для протонов выбранного пика белка может быть рассчитано по моноэкспоненциальной зависимости A_p против τ_2 .

Способ А: сбор данных.

Спектрометр ЯМР Agilent DD2 600 МГц оснащен модулем Agilent ^1H - ^{19}F / ^{15}N - ^{31}P PFG OneProbe. Градиенты температуры зонда и градиенты импульсного поля калибруются с образцами этиленгликоля и 1% H_2O в D_2O , соответственно. Спектр ЯМР получен при 30,0°C с помощью последовательности импульсов стимулированного эха биполярной импульсной пары (англ. "bppste"). Число сканирований составляет 64. Параметры сбора данных включают в себя спектральную ширину - 20 ppm, время сбора данных - 1,363 с, релаксационную задержку - 30 с, диффузионную задержку - 150 мс, градиентные импульсы с длительностью 1,4 мс и с силой 0,569 Тл/м (92% от максимума), и стабилизационную задержку градиента - 1 мс.

Для измерения коэффициента трансляционной диффузии (D) параметры сбора данных включают в себя релаксационную задержку - 1 с, диффузионную задержку - 200 мс, длительность диффузионного градиента - 2,0 мс, стабилизационную задержку градиента - 0,5 мс и семь значений силы градиента в диапазоне от 0,228 до 0,569 Тл/м (ок. 37-92% от максимума) с логарифмическим интервалом. Время спин-решеточной ядерной релаксации (T_1) измеряется с помощью последовательности импульсов bppste с использованием спектральной ширины в 20 ppm, времени сбора данных в 1,363 с, релаксационной задержки в 3,637 с, длительности градиента диффузии в 2,0 мс и стабилизационной задержки градиента в 0,5 мс. Используются пять пар значений - (100 мс, 0,569 Тл/м); (203 мс, 0,400 Тл/м); (408 мс, 0,281 Тл/м); (804 мс, 0,200 Тл/м); и (1202 мс, 0,164 Тл/м) - диффузионной задержки и силы градиента.

Время спин-спиновой ядерной релаксации (T_2) также измеряется с помощью последовательности импульсов bppste с использованием спектральной ширины в 20 ppm, времени сбора данных в 1,363 с, релаксационной задержки в 1 с и длительности градиента диффузии в 1,4 мс. Используются шесть наборов параметров стабилизационной задержки градиента, диффузионной задержки и силы градиента - (1 мс, 150,001 мс, 0,570 Тл/м); (2 мс, 150,002 мс, 0,571 Тл/м); (4 мс, 150,004 мс, 0,573 Тл/м); (8 мс, 150,008 мс, 0,577 Тл/м); (12 мс, 150,012 мс, 0,581 Тл/м); и (16 мс, 150,016 мс, 0,575 Тл/м).

Анализ данных.

Данные ДФ-кЯМР, T_1 и T_2 обрабатываются в программе MNOVA, версия 11.0 (Mestrelab Research, SL, Сантьяго-де-Компостела, Испания), а данные по диффузии обрабатываются и анализируются с помощью программного обеспечения DOSYToolbox, версия 2.5 (Nilsson, M. J. Magn. Reson. 2009, 200, 296-302). Параметры FID обнуляются один раз и умножаются на функцию экспоненциального окна в 2,93 Гц перед преобразованием Фурье. Коэффициенты диффузии получают с использованием алгоритма DECRA, доступного в программе DOSYToolbox. Значения T_1 и T_2 вычисляются на основании последовательности импульсов bppste посредством регрессионного анализа с использованием программного обеспечения MATLAB 2016b (MathWorks, Inc., Натик, Массачусетс, США). Площади пиков металльных групп лейцина, изолейцина и (или) валина получают деконволюцией с использованием процедуры подбора линий в программе MNOVA или CRAFT.

Использование способа А с антителом NIST RM 8761.

Чтобы проиллюстрировать проблемы количественного определения больших белков, находящихся в композиции, с помощью ЯМР, образец NIST RM 8761 (10 г/л антитела, 12,5 mM L-гистидин HCl, pH 6,0, коммерчески доступен из Национального института стандартов и технологий США (NIST); см., например, Schiel et al., Anal. and Bioanal. Chem., 410(8): 2127-2139 (2018)) обрабатывают 10% D₂O и получают спектр ¹H 1D ЯМР (фиг. 2). Сигнал от воды настолько интенсивен и широк, что скрывает сигналы от антитела. Пики гистидинового эксципиента также наблюдаются в данном спектре. Чтобы получить реальный спектр белка, эти доминирующие пики должны быть устранены. Одна из методик ЯМР, которая идеально подходит для этого применения, представляет собой "диффузионный фильтр", в котором пики исключаются из спектра на основе коэффициентов диффузии и, следовательно, размера соответствующих молекул. Спектр ¹H-ЯМР, полученный на том же образце NIST мАт с помощью последовательности импульсов стимулированного эха биполярной импульсной пары (bppste) в качестве диффузионного фильтра, также показан на фиг. 2. Диффузионный фильтр эффективен при удалении нежелательных сигналов от композиции и не вносит артефактов в базовую линию или фазовых искажений.

Тем не менее, в большинстве случаев разрешающая способность является недостаточной для точной идентификации и интегрирования пиков из-за характерной широкой ширины линий резонансов белка. В первую очередь это связано со структурой высшего порядка (СВП, англ. "HOS") белка. Один и тот же тип аминокислоты, который в противном случае имел бы очень похожие химические сдвиги, демонстрирует широкое распределение химического сдвига из-за уникального магнитного окружения, являющегося результатом вторичной, третичной и четвертичной структуры белка. Следовательно, СВП удаляется путем денатурирования белка. Добавление денатурирующего агента к раствору белка приводит к увеличению объема образца. Для точного количественного определения добавляется больше растворителя с целью достижения точного объема, например, с помощью мерной колбы. Это основа для f_{DF} в уравнении 1.

¹H-ЯМР после применения диффузионного фильтра для образца NIST RM 8761, приготовленного с использованием 6 M гуанидиния-d₆, показан на фиг. 2. Наблюдается уменьшение ширины спектральной линии и последующее увеличение соотношения сигнал - шум. Группы пиков между 1,0-1,4 ppm, которые соответствуют металльным группам изолейцина, лейцина и (или) валина, имеют разрешение, близкое к базовой линии, что позволяет интегрировать их для количественного анализа.

Диффузионный фильтр эффективен при отделении белковых сигналов от матрицы; тем не менее, диффузионный фильтр приводит к изначально недостаточному количественному определению измеренных площадей пиков ЯМР. В рутинных экспериментах кЯМР используется простая последовательность импульсов ЯМР, которая состоит из трех основных элементов: задержки ядерной релаксации, одного радиочастотного импульса и периода сбора данных. Когда используется достаточно большая задержка ядерной релаксации, результирующая площадь пика ЯМР точно и воспроизводимо пропорциональна количеству наблюдаемых ядер; таким образом, эксперимент носит количественный характер. Для всех других последовательностей импульсов ЯМР, включая используемую в контексте данного изобретения диффузионную последовательность, требуется несколько радиочастотных импульсов, разделенных различными задержками. Следовательно, результирующие спектры больше не являются количественными по своей сути из-за факторов, которые ослабляют пики от равновесного значения. Однако, если эти факторы известны и степень ослабления может быть рассчитана, диффузионный фильтр можно сделать количественным. Это основа для f_{DF} в уравнении 1.

Внешний референсный стандарт является более предпочтительным, чем внутренний референсный стандарт, поскольку первый позволяет избежать потенциальных взаимодействий между двумя молекулами и (или) перекрытия пиков в спектре ЯМР, хотя можно использовать и внутренний стандарт. Было описано несколько внешних стандартных способов, в том числе методика PULCON (т.е. определение концентрации на основании длительность импульса). Этот способ коррелирует абсолютные площади двух отдельных спектров, одного - от референсного стандарта и другого - от аналита, даже если условия раствора и экспериментальные параметры различаются. Следовательно, внешний референсный стандарт не обязательно должен иметь такие же характеристики, как и представляющий интерес аналит, или даже быть белком. Кроме того, вместо стандарта для каждой аминокислоты, как в случае с АКА, для этого

способа требуется только один стандарт.

Чтобы продемонстрировать достоверность и точность способа А, оценивали три независимых повторности образца NIST RM 8761. Достаточное отношение сигнал - шум для этой белковой композиции с концентрацией 10 г/л было достигнуто с использованием только 64 сканирований и общего времени сбора данных в 37 мин. Группа сигналов для металльных групп от I/L/V (изолейцина/лейцина/валина) в данном белке (1,0-1,4 ppm), что соответствует 1476 протонам, имела разрешение, близкое к базовой линии. Эти результаты обеспечивают точную интеграцию для количественного анализа. Для облегчения расчета концентрации, T₁, T₂ и D также измеряли для этой группы пиков с помощью последовательности импульсов bprpste, как описано выше, а сбор данных и выполненный анализ показаны на фиг. 3 и 4.

Общее время эксперимента для всех четырех экспериментов ЯМР в одной повторности составило 110 мин. Затем рассчитывали концентрацию каждой повторности по формуле из Ур. 9 с использованием интактной негликозилированной молекулярной массы (148041 Да) и коэффициента разбавления, основанного на массе аликвоты и измеренной физической плотности образца. Средняя концентрация составила 10,02 г/л с относительным стандартным отклонением (ОСО) в 0,55%. Это соответствует указанному на этикетке значению в 10 г/л.

Эти данные демонстрируют, что способ А можно использовать для достоверного и точного определения концентрации антителя.

Использование способа А с бычьим сывороточным альбумином из NIST (NIST БСА).

Стандартный референсный материал 927e из NIST (БСА) (67,38 г/л, 20 мМ хлорида натрия, рН доведен до 6,5-6,8 с помощью 1,0 моль/л гидроксида натрия, коммерчески доступен из Национального института стандартов и технологий США) разбавляли гравиметрическим способом до четырех дополнительных концентраций белка (табл. 1, образцы В1-В4). В общей сложности анализировали четырнадцать образцов, включая шесть повторностей для средней концентрации (В3), три повторности для каждой из максимальной (В5) и минимальной (В1) концентрации, и единичные повторности для промежуточных концентраций (В2 и В4). Образец ЯМР для каждой повторности готовили так, как описано выше. Сбор и анализ данных по способу А выполняли так, как описано выше. Полученные четырнадцать спектров ДФ-кЯМР показаны в наложении друг на друга на фиг. 5.

Эти данные демонстрируют, что пик от воды почти устранен, базовая линия не нарушена, и группа сигналов для металльных групп I/L/V в белке имеет разрешение, близкое к базовой линии. Концентрацию для каждого образца рассчитывали по формуле из Ур. 1 с использованием молекулярной массы в 66398 Да, и результаты приведены в табл. 1. Для всех пяти концентраций значение, измеренное способом А, аналогично значению, рассчитанному на основе гравиметрического разбавления. Как показано ниже в табл. 1, ОСО составляет менее 1% для всех трех наборов повторностей.

Таблица 1. Результаты для образцов NIST БСА.

Образец	Способ А, конц. (г/л)	ОСО	Гравиметрич. способ, конц. (г/л)	Разница
В1	9,297	0,61 %	9,525	2,39 %
В2	23,90	--	23,91	0,04 %
В3	37,53	0,81 %	38,11	1,54 %
В4	52,50	--	52,82	0,60 %
В5	66,18	0,82 %	67,38	1,78 %

Как показано на фиг. 6, график зависимости концентраций, полученных с помощью способа А, от концентраций, полученных с помощью гравиметрического способа, имеет линию регрессии с R² = 0,9997, что указывает на линейность во всем исследованном диапазоне концентраций.

Эти данные демонстрируют, что способ А можно использовать для достоверного и точного определения концентрации белка среднего размера в широком диапазоне концентраций.

На фиг. 7 показан график зависимости физической плотности образца от концентрации белка, определенной с помощью способа А. Уравнение, связывающее две величины, имеет вид

$$\rho = \rho_0 + (1 - \bar{v}\rho_0)(c/1000),$$

как определено выше. На основании наклона линии регрессии определяется парциальный удельный объем (\bar{v}) БСА, который составил 0,718 мл/г.

Использование способа А с биспецифическим антителиком.

Образцы биспецифического антителя (определены последовательностями из табл. 1 патента США № 9718884) с пятью различными концентрациями и в общей сложности 14 образцами были приготовлены так, как описано выше. Сбор и анализ данных по способу А выполняли так, как описано выше. В соответствии с процедурами, по существу описанными выше, были получены следующие данные.

На фиг. 8 показаны результирующие спектры ДФ-кЯМР, которые по общему виду и качеству аналогичны спектрам БСА (показанным выше). Концентрации были рассчитаны по формуле из Ур. 1, с ис-

пользованием теоретической молекулярной массы интактного негликозилированного белка (~ 200000 Да), и обобщенно приведены в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Результаты для биспецифического антитела.

Образец	Способ А, конц. (г/л)	ОСО	Оценочная конц. (г/л)	Разница
C1	9,427	0,25 %	9,277	-1,61 %
C2	24,59	--	24,61	0,09 %
C3	41,62	1,25 %	39,67	-4,92 %
C4	54,43	--	55,02	1,07 %
C5	78,37	0,85 %	74,01	-5,89 %

Как показано на фиг. 9, график зависимости концентраций, полученных с помощью способа А, от концентраций, полученных с помощью гравиметрического способа, имеет линию регрессии с $R^2 = 0,996$.

Эти данные демонстрируют, что способ А можно использовать для определения концентрации биспецифического антитела в очень широком диапазоне концентраций.

Использование способа А с пептидом ~ 5000 Да.

Образцы разбавленного небольшого пептида (ок. 5000 Да; задан последовательностью в примере 4 из PCT/US 2017/041922) готовят с хаотропным агентом и без него так, как описано выше. Более низкая концентрация денатурирующего агента (2 М) является приемлемой, поскольку пептид в нативной форме представляет собой случайную спираль, и концентрация низкая. Для стабильности образца требуются основные условия; следовательно, используется мочевины-d₄. Сбор и анализ данных по способу А выполняли так, как описано выше, за исключением того, что для каждого сбора данных было выполнено 624 сканирования вместо 64 сканирований. Следуя процедурам, по существу, так, как описано выше, были получены следующие данные. Для сигнала остаточной воды наблюдалось небольшое фазовое искажение, но это не мешало анализу данных. Добавление хаотропного агента привело к лучшему подавлению воды, более отчетливым пикам и, как следствие, большему разрешению и чувствительности. Концентрация каждой повторности рассчитывалась по формуле из Ур. 1. Средняя концентрация общего белка составила 0,65 г/л с ОСО в 3,6%. Это значение было аналогично значению, полученному с помощью способа баланса массы (0,63 г/л). Эти данные демонстрируют, что способ А можно использовать с разбавленным образцом небольшого пептида.

Иллюстративные варианты реализации данного изобретения

Ниже следует список, содержащий иллюстративные варианты реализации данного изобретения в соответствии с данным раскрытием, которые представляют собой различные варианты реализации данного изобретения в соответствии с данным раскрытием. Указанные иллюстративные варианты реализации данного изобретения не предназначены для того, чтобы быть исчерпывающими или ограничивать данное раскрытие точными раскрытыми формами, но, вместо этого, указанные иллюстративные варианты реализации данного изобретения предоставлены для помощи в дальнейшем описании данного раскрытия, чтобы другие специалисты в данной области техники могли использовать представленные в них идеи.

1. Способ определения концентрации белка или пептида в растворе, при этом указанный способ включает в себя:

- (i) денатурирование белка или, необязательно, денатурирование пептида;
- (ii) выполнение КЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром; и
- (iii) расчет концентрации белка или пептида с использованием референсного стандарта и референсной методики.

2. Способ по варианту реализации данного изобретения 1, отличающийся тем, что указанный пептид денатурирован.

3. Способ по варианту реализации данного изобретения 1 или по варианту реализации данного изобретения 2, отличающийся тем, что указанный белок или пептид денатурируют с помощью хаотропного агента.

4. Способ по варианту реализации данного изобретения 3, отличающийся тем, что указанный хаотропный агент представляет собой гуанидиния хлорид-d₆ или мочевины-d₄.

5. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-4, в котором референсный стандарт представляет собой внешний референсный стандарт.

6. Способ по варианту реализации данного изобретения 5, отличающийся тем, что указанный внешний референсный стандарт представляет собой низкомолекулярный первичный стандарт.

7. Способ по варианту реализации данного изобретения 5, отличающийся тем, что указанный внешний референсный стандарт представляет собой малеиновую кислоту.

8. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-7, отличающийся тем, что раствор содержит D₂O.

9. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-8, отличающийся тем, что референсная методика представляет собой методику PULCON.

10. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-9, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой антитело.

11. Способ по варианту реализации данного изобретения 10, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

12. Способ по варианту реализации данного изобретения 10, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело.

13. Способ определения молекулярного параметра белка или пептида в растворе, при этом указанный способ включает в себя:

(i) денатурирование белка или, необязательно, денатурирование пептида;

(ii) выполнение кЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром;

(iii) расчет концентрации белка или пептида с использованием референсного стандарта и референсной методики; и (iv) определение молекулярного параметра белка или пептида на основании рассчитанной концентрации.

14. Способ по варианту реализации данного изобретения 13, отличающийся тем, что указанный пептид денатурирован.

15. Способ по варианту реализации данного изобретения 13 или по варианту реализации данного изобретения 14, отличающийся тем, что указанный молекулярный параметр представляет собой коэффициент экстинкции.

16. Способ по варианту реализации данного изобретения 15, отличающийся тем, что указанный коэффициент экстинкции определяется законом Бера - Ламберта.

17. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13-16, отличающийся тем, что указанный белок или пептид денатурируют с помощью хаотропного агента.

18. Способ по варианту реализации данного изобретения 17, отличающийся тем, что указанный хаотропный агент представляет собой гуанидиния хлорид-d₆ или мочевины-d₄.

19. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13-18, отличающийся тем, что указанный референсный стандарт представляет собой внешний референсный стандарт.

20. Способ по варианту реализации данного изобретения 19, отличающийся тем, что указанный внешний референсный стандарт представляет собой низкомолекулярный первичный стандарт или малеиновую кислоту.

21. Способ по варианту реализации данного изобретения 20, отличающийся тем, что указанный внешний референсный стандарт представляет собой низкомолекулярный первичный стандарт.

22. Способ по варианту реализации данного изобретения 20, отличающийся тем, что указанный внешний референсный стандарт представляет собой малеиновую кислоту.

23. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13-22, отличающийся тем, что раствор содержит D₂O.

24. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13-23, отличающийся тем, что референсная методика представляет собой методику PULCON.

25. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13, 15-24, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой антитело.

26. Способ по варианту реализации данного изобретения 25, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

27. Способ по варианту реализации данного изобретения 25, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело.

28. Способ определения молекулярного параметра белка или пептида в контрольной партии, при этом указанный способ включает в себя:

a) денатурирование белка или, необязательно, денатурирование пептида;

b) выполнение кЯМР-спектроскопии с диффузионным фильтром;

c) расчет концентрации белка или пептида с использованием референсного стандарта и референсной методики; и

d) определение молекулярного параметра белка или пептида на основании рассчитанной концентрации.

29. Способ по п.28, дополнительно включающий в себя определение концентрации белка или пептида в тестовой партии, при этом указанная концентрация пептида или белка в тестовой партии определяется на основании молекулярного параметра.

30. Способ по варианту реализации данного изобретения 28 или по варианту реализации данного изобретения 29, отличающийся тем, что указанный молекулярный параметр представляет собой коэффициент экстинкции.

31. Способ по варианту реализации данного изобретения 30, отличающийся тем, что указанный коэффициент экстинкции определяется по закону Бера-Ламберта.

32. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 28-31, отличающийся тем, что

указанный пептид денатурирован.

33. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 28-32, отличающийся тем, что указанный белок или пептид денатурирован с помощью хаотропного агента.

34. Способ по варианту реализации данного изобретения 33, отличающийся тем, что указанный хаотропный агент представляет собой гуанидиния хлорид-d₆ или мочевины-d₄.

35. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 28-34, отличающийся тем, что референсный стандарт представляет собой внешний референсный стандарт.

36. Способ по варианту реализации данного изобретения 35, отличающийся тем, что указанный внешний референсный стандарт представляет собой низкомолекулярный первичный стандарт.

37. Способ по варианту реализации данного изобретения 35, отличающийся тем, что указанный внешний референсный стандарт представляет собой малеиновую кислоту.

38. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 28-37, отличающийся тем, что раствор содержит D₂O.

39. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 28-38, отличающийся тем, что референсная методика представляет собой методику PULCON.

40. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 28-31, 33-39, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой антитело.

41. Способ по варианту реализации данного изобретения 40, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

42. Способ по варианту реализации данного изобретения 40, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой биспецифическое антитело.

43. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13-42, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает в себя использование молекулярного параметра для определения концентрации белка или пептида при составлении композиции белка или пептида.

44. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13-42, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает в себя использование молекулярного параметра для определения концентрации белка или пептида в испытании при выпуске серии.

45. Способ по варианту реализации данного изобретения 44, отличающийся тем, что указанное испытание при выпуске серии представляет собой УФ-испытание при выпуске серии.

46. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13-42, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает в себя использование молекулярного параметра для определения концентрации белка или пептида при приготовлении серии.

47. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13-42, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает в себя использование молекулярного параметра для определения концентрации белка или пептида при определении дозы белка или пептида.

48. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 13-42, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает в себя использование молекулярного параметра для определения концентрации белка или пептида во время производственного процесса.

49. Способ по любому из вариантов реализации данного изобретения 1-48, отличающийся тем, что указанный белок или пептид представляет собой активный ингредиент в дулаглутиде, иксекизумабе, рамуцирумабе, цетуксимабе, оларагумабе, нецитумабе, галканезумабе или мирикизумабе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения абсолютной концентрации белка в растворе белка, включающий в себя следующие стадии:

- a) денатурирование белка;
- b) выполнение кЯМР-спектроскопии денатурированного белка, при этом указанная стадия выполнения кЯМР-спектроскопии включает в себя использование диффузионного фильтра; и
- c) расчет абсолютной концентрации белка с использованием референсного стандарта и референсной методики.

2. Способ определения молекулярного параметра белка в растворе, включающий в себя следующие стадии:

- a) денатурирование белка;
- b) выполнение кЯМР-спектроскопии денатурированного белка, при этом указанная стадия выполнения кЯМР-спектроскопии включает в себя использование диффузионного фильтра;
- c) расчет абсолютной концентрации белка, включающий в себя использование референсного стандарта и референсной методики; и
- d) определение молекулярного параметра белка на основании рассчитанной концентрации белка.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что указанный молекулярный параметр белка включает в себя коэффициент экстинкции, показатель преломления или парциальный удельный объем.

4. Способ по п.3, отличающийся тем, что указанный коэффициент экстинкции определяется зако-

ном Бера-Ламберта.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанный белок денатурирован с помощью хаотропного агента.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что указанный хаотропный агент представляет собой гуанидиния хлорид-d₆ или мочевино-d₄.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что референсный стандарт представляет собой внешний референсный стандарт.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанный внешний референсный стандарт представляет собой низкомолекулярный первичный стандарт.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что указанный внешний референсный стандарт представляет собой малеиновую кислоту.

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что раствор содержит D₂O.

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что референсная методика представляет собой методику PULCON.

12. Способ по любому из пп.2, 7-11, отличающийся тем, что указанный молекулярный параметр представляет собой молекулярный параметр белка в контрольной партии.

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что указанный молекулярный параметр белка в контрольной партии используется для определения абсолютной концентрации белка в тестовой партии.

14. Способ по любому из пп.2, 7-11, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает в себя использование молекулярного параметра для определения концентрации белка в испытании при выпуске серии, в приготовлении серии, во время производственного процесса, при определении дозы белка, для аликвотирования белка или для составления композиции белка.

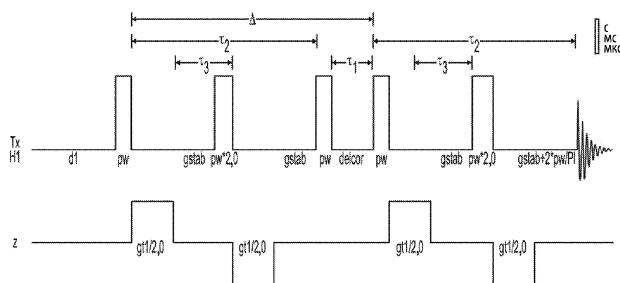
15. Способ по п.13, отличающийся тем, что указанное испытание при выпуске серии включает в себя УФ-испытание.

16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой антитело.

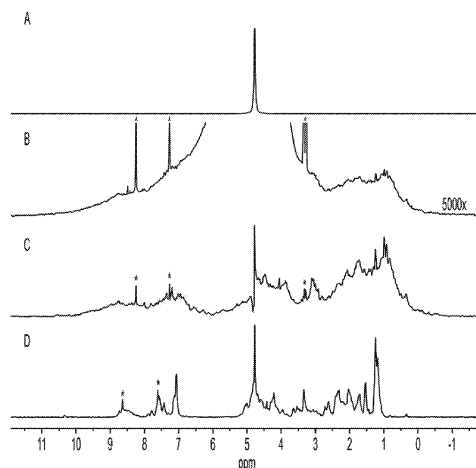
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело, триспецифическое антитело или тетраспецифическое антитело.

18. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой слитый белок.

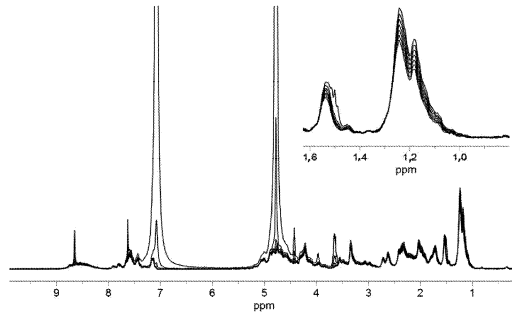
19. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что указанный белок представляет собой пептид.



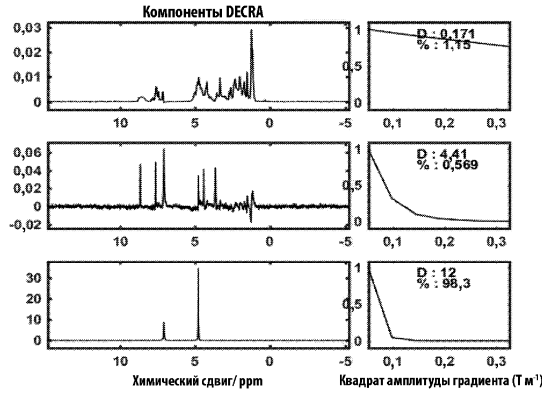
Фиг. 1



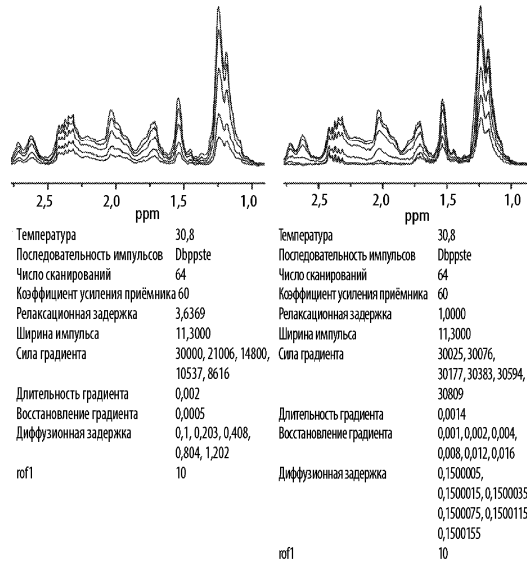
Фиг. 2



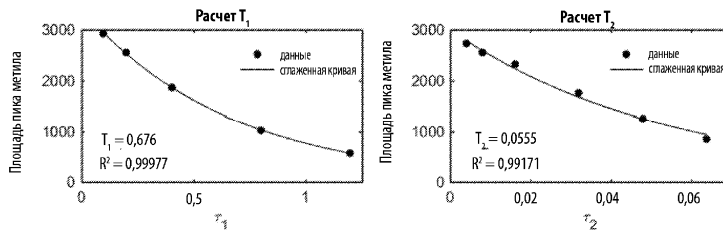
Фиг. 3а



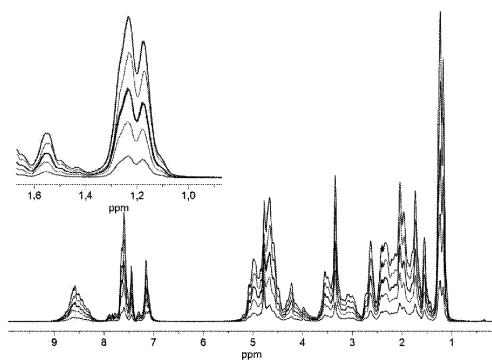
Фиг. 3б



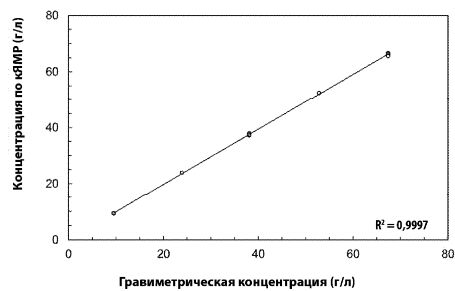
Фиг. 4а



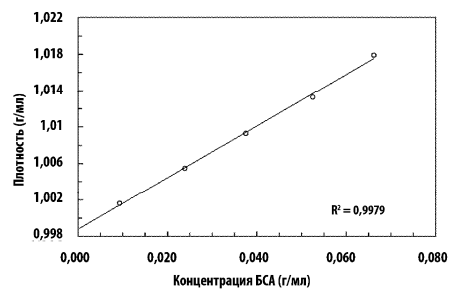
Фиг. 4б



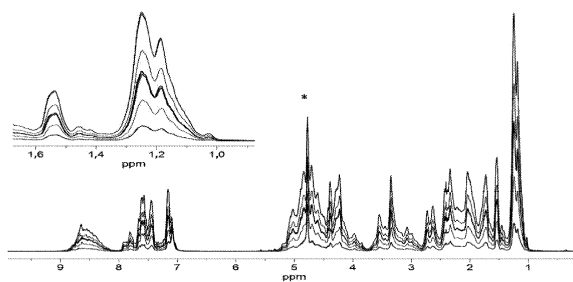
Фиг. 5



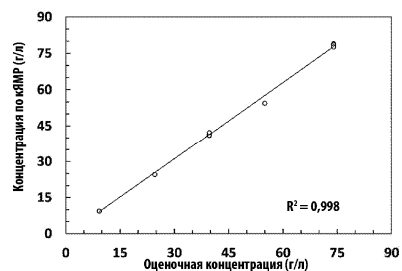
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

