

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191931 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.02.14

(51) Int. Cl. *G01N 33/68* (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
G01N 21/65 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.01.29

(54) СПОСОБ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ВИДИМЫХ И/ИЛИ НЕВИДИМЫХ ЧАСТИЦ В
БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

(31) 62/798,750

(32) 2019.01.30

(33) US

(86) PCT/US2020/015699

(87) WO 2020/160161 2020.08.06

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Сюй Сяобинь (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном изобретении предложен способ характеристики или количественного определения одного или более белков в видимых и/или невидимых частицах, образованных в образце, путем обнаружения по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце, выделения и захвата по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для определения присутствия белка и использование масс-спектрометра для характеристики белка.

A1

202191931

202191931

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-570063ЕА/042

СПОСОБ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ВИДИМЫХ И/ИЛИ НЕВИДИМЫХ ЧАСТИЦ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение в общем относится к способу характеристики или количественного определения одного или более белков в видимых и/или невидимых частицах, образованных в образце.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Биофармацевтические препараты, содержащие белок, стали важными лекарственными средствами для лечения онкологического заболевания, аутоиммунных заболеваний, инфекций и кардиометаболических нарушений, и представляют собой один из наиболее быстрорастущих сегментов фармацевтической промышленности. Надежные и стабильные биофармацевтические препараты являются ключевым элементом успешной поставки в биофармацевтической промышленности. Ключевым критерием является разработка составов, практически свободных от видимых и/или невидимых частиц. Видимые и/или невидимые частицы, особенно в таких биофармацевтических препаратах, содержащих белок, в течение нескольких лет были предметом дискуссий и исследований в биофармацевтической промышленности. Состоящие из синтетических или биологических материалов, и происходящие из различных источников, частицы могут повысить потенциал иммуногенных эффектов у пациентов и могут по-разному влиять на лекарственное средство. Таким образом, может быть важным исследовать происхождение, состав и последствия этих частиц, чтобы помочь уменьшить их количество или исключить их из лекарственных средств.

В случае, если в биофармацевтических препаратах присутствуют видимые и/или невидимые частицы, идентификация их состава является критическим шагом в понимании и препятствовании их образования. Однако, определение рабочего процесса и аналитических методов контроля является сложной задачей, поскольку эти частицы имеют малый размер, хрупкие, их трудно изолировать, и они состоят только из небольшой массы материала. Из вышесказанного следует, что существует потребность в улучшенных способах характеристики таких видимых и/или невидимых частиц, которые могут образовываться в образце.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ключевым критерием при разработке биофармацевтических препаратов является разработка составов, не содержащих видимых и невидимых частиц. Когда такие частицы действительно появляются, их идентификация и количественное определение могут стать важным шагом в биопроцессе.

Раскрытые в данном документе примерные варианты реализации соответствуют вышеупомянутым требованиям, предлагая способы для характеристики, идентификации и/или количественного определения белка(ов) по меньшей мере в одной видимой или

невидимой частице в образце.

В данном изобретении по меньшей мере частично предлагается способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце.

В одном примерном варианте реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце включает обнаружение по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце, выделение и захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для определения присутствия белка, и использование масс-спектрометра для характеристики белка.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать определение присутствия белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице с использованием рамановской спектроскопии.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать по меньшей мере одну видимую или невидимую частицу, имеющую размер по меньшей мере около 5 мкм.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать по меньшей мере одну видимую или невидимую частицу, содержащую изначальную примесь.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы на поликарбонатную мембрану с золотым покрытием.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы на поликарбонатную мембрану с золотым покрытием с размером пор около 5 мкм.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать растворение образца в мочеvine после идентификации присутствия белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать растворение образца в гидрохлориде гуанидина после идентификации присутствия белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики

белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать растворение образца в 8 М растворе мочевины после идентификации присутствия белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать расщепление образца в денатурирующих условиях после идентификации присутствия белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать образец, который дополнительно содержит представляющий интерес белок.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать образец, который дополнительно содержит антитело.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать образец, который дополнительно содержит терапевтическое антитело.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать систему жидкостной хроматографии, соединенную с масс-спектрометром.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать систему наножидкостной хроматографии, соединенную с масс-спектрометром.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать использование tandemного масс-спектрометра для характеристики белка.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать белок, который является белком клетки-хозяина.

В данном изобретении по меньшей мере частично предлагается способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце.

В одном примерном варианте реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце включает обнаружение по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце, выделение и захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для определения присутствия белка, и использование масс-спектрометра для характеристики белка.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для

идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать определение присутствия белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице с использованием рамановской спектроскопии.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать по меньшей мере одну видимую или невидимую частицу, имеющую размер по меньшей мере около 5 мкм.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может быть изначальной примесью.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы на поликарбонатную мембрану с золотым покрытием.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы на поликарбонатную мембрану с золотым покрытием с размером пор около 5 мкм.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать растворение образца в мочеvine после идентификации присутствия белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать растворение образца в 8 М растворе мочеvine после идентификации присутствия белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать расщепление образца в денатурирующих условиях после идентификации присутствия белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать образец, который дополнительно содержит представляющий интерес белок.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в

образце может включать образец, который дополнительно содержит антитело.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать образец, который дополнительно содержит терапевтическое антитело.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать систему жидкостной хроматографии, соединенную с масс-спектрометром.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать систему наножидкостной хроматографии, соединенную с масс-спектрометром.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать использование тандемного масс-спектрометра для характеристики белка.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать белок, который является белком клетки-хозяина.

В данном изобретении по меньшей мере частично предлагается способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце.

В одном примерном варианте реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце включает обнаружение по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце, выделение и захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для определения присутствия белка, и использование масс-спектрометра для характеристики белка с целью определить, является ли белок белком клетки-хозяина.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанное определение белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать определение белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице с использованием рамановской спектроскопии.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанное определение белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать по меньшей мере одну видимую или невидимую частицу, имеющую размер по меньшей мере около 5 мкм.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать белок клетки-хозяина, который может быть изначальной примесью.

В одном аспекте данного варианта реализации, способ идентификации белка

клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы на поликарбонатную мембрану с золотым покрытием.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы на поликарбонатную мембрану с золотым покрытием с размером пор около 5 мкм.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать растворение образца в мочеvine после идентификации присутствия белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать растворение образца в 8 М растворе мочевины после идентификации присутствия белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может дополнительно включать расщепление образца в денатурирующих условиях после идентификации присутствия белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать образец, который дополнительно содержит представляющий интерес белок.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать образец, который дополнительно содержит антитело.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать образец, который дополнительно содержит терапевтическое антитело.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать систему жидкостной хроматографии, соединенную с масс-спектрометром.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой

частице в образце может включать систему наножидкостной хроматографии, соединенную с масс-спектрометром.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать использование tandemного масс-спектрометра для характеристики белка.

В одном аспекте данного варианта реализации, указанный способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце может включать белок, который является белком клетки-хозяина.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 продемонстрирован диапазон размеров частиц, содержащихся в лекарственных препаратах (в микронах).

На Фиг. 2 продемонстрированы типы твердых частиц в лекарственных препаратах.

На Фиг. 3 представлена схематическая схема общего механизма агрегатов белка.

На Фиг. 4 перечислены возможные причины образования частиц в лекарственных препаратах.

На Фиг. 5 представлен график отзывов FDA лекарственных средств из-за наличия твердых частиц за 2005-2017 годы.

На Фиг. 6 представлена диаграмма, демонстрирующая причины отзыва FDA стерильных инъекционных лекарственных средств с 2008 по 2012 год.

На Фиг. 7 представлены два рабочих способа для характеристики белка или белка клетки-хозяина согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 8 представлены два рабочих процесса для характеристики белка или белка клетки-хозяина согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 9 представлен способ захвата видимой или невидимой частицы согласно одному примерному варианту реализации.

На Фиг. 10 представлен вырезы на фильтровальной бумаге, сделанные для оценки видимых или невидимых частиц согласно одному примерному варианту реализации.

На Фиг. 11 продемонстрировано сравнение количества пептидных фрагментов mAb1 на вырезанных участках фильтровальной бумаги, используемой для захвата видимой или невидимой частицы в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 12 представлен способ захвата видимой или невидимой частицы на поликарбонатную мембрану с золотым покрытием в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 13 продемонстрировано темнопольное освещение частиц, проанализированных с помощью рамановской спектроскопии, изолированных и захваченных поликарбонатной мембраной с золотым покрытием в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 14 продемонстрировано относительное содержание ингибитора металлопротеиназы 1 (TIMP1) в растворах лекарственных средств из различных партий

(партии 5-12), проанализированных в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 15 продемонстрировано относительное содержание хемокина 13 с мотивом С-С (CCL13) в растворах лекарственных средств из различных партий (партии 5-12), проанализированных в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 16 продемонстрировано относительное количественное определение белков клетки-хозяина, идентифицированных в образцах с высокой молекулярной массой, с использованием направленной ЖХ-МС/МС в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 17 представлен способ захвата видимой или невидимой частицы соответственно на золотом фильтре согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 18 представлен способ выделения видимой или невидимой частицы на золотом фильтре согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 19 продемонстрировано подтверждение присутствия белка в видимой или невидимой частице с использованием рамановской спектроскопии в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 20 продемонстрировано содержание mAb1 в частицах, охарактеризованных в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 21 продемонстрировано темное заполненное изображение образца, содержащего невидимые частицы, снятого в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 22 продемонстрировано темное заполненное изображение и рамановское изображение образца, содержащего невидимые частицы, снятого в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 23 продемонстрирован график уменьшения емкости V_{max} и мутности во времени для двух фильтров, используемых для определения характеристик частиц согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 24 продемонстрировано вырезание фильтровальной бумаги, выполненное согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 25 продемонстрирован график нормализованного содержания тяжелой цепи и легкой цепи mAb2 в частицах за 72 часа для частицы, содержащей mAb2, полученный в соответствии с примерным вариантом реализации.

На Фиг. 26 продемонстрирован параллельный график относительного количества белков клетки-хозяина в зависимости от времени для частицы, содержащей mAb2, полученный согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 27 продемонстрирован пузырьковый график соотношения содержания белков клетки-хозяина в частице в момент времени $T=0$ часов к белкам клетки-хозяина в частице в момент времени $T=0$ часов по отношению к относительному количеству mAb2 в частице в момент времени $T=0$ часов, согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 28 продемонстрирован пузырьковый график соотношения содержания белков клетки-хозяина в частице в момент времени $T=24$ часов к белкам клетки-хозяина в

частице в момент времени $T=0$ часов по отношению к относительному количеству mAb2 в частице в момент времени $T=24$ часов, согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 29 продемонстрирован пузырьковый график соотношения содержания белков клетки-хозяина в частице в момент времени $T=48$ часов к белкам клетки-хозяина в частице в момент времени $T=0$ часов по отношению к относительному количеству mAb2 в частице в момент времени $T=48$ часов, согласно примерному варианту реализации.

На Фиг. 30 продемонстрирован пузырьковый график соотношения содержания белков клетки-хозяина в частице в момент времени $T=72$ часов к белкам клетки-хозяина в частице в момент времени $T=0$ часов по отношению к относительному количеству mAb2 в частице в момент времени $T=72$ часов, согласно примерному варианту реализации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Присутствие видимых и невидимых частиц является основной проблемой при разработке лекарственных средств, содержащих белки. Эти частицы могут быть белковыми или небелковыми, и нуждаться в анализе для контроля стабильности состава. Растущие опасения по поводу иммуногенного потенциала таких частиц в лекарственных препаратах требуют надежного метода и/или рабочего процесса для характеристики их содержания.

Основной проблемой при разработке лекарственных препаратов, содержащих белки, является преодоление их ограниченной стабильности. Агрегация представляет собой один из самых серьезных механизмов деградации. Агрегаты могут различаться по многим параметрам, таким как размер, обратимость и структура. Например, их размер может варьироваться от димеров в нанометровом диапазоне до крупных агрегатов в сотни микрон, которые видны человеческому глазу (см. Фиг. 1). Агрегаты могут содержать как белковые, так и небелковые частицы, например, происходящие из упаковочного материала или вспомогательных веществ, влияющих на качество продукта и, следовательно, нуждающиеся в анализе.

Как описано в Фармакопее США, главы, обозначенные «Видимые частицы в инъекциях <790>» и «Невидимые частицы в инъекциях терапевтических белков <1787>», помогают предоставить общие рекомендации по содержанию твердых частиц в лекарственных продуктах. Типы твердых частиц, которые могут присутствовать в лекарственных препаратах, показаны на Фиг. 2.

Твердые частицы, присущие лекарственным препаратам, как показано на Фиг. 2 могут содержать агрегированный белок. Агрегация может происходить за счет различных типов различных механизмов и путей (см. Фиг. 3). Эти механизмы не исключают друг друга и могут происходить параллельно в одном и том же продукте (John Philo & Tsutomu Arakawa, Mechanisms of Protein Aggregation, 10 CURRENT PHARMACEUTICAL BIOTECHNOLOGY 348-351 (2009)). Преобладающие механизмы зависят не только от самого белка, но и от множества других факторов, таких как состав, наличие примесей или загрязняющих веществ, а также воздействие химического или физического стресса, упомянутого выше. В настоящее время не до конца понятно, как различные механизмы

агрегации и, как следствие, структурные различия агрегатов влияют на их потенциальную иммуногенность.

Некоторые из потенциальных причин образования частиц в лекарственных продуктах, перечисленных на Фиг. 4, вызваны термическим стрессом, разложением во время хранения, химическим разложением вспомогательных веществ в лекарственном препарате, механическим стрессом и межфазным стрессом. Потенциальные последствия присутствия таких частиц в лекарственных препаратах могут сделать продукт небезопасным (вызвать закупорку капиллярных кровеносных сосудов, иммуногенность или цитотоксичность), изменить эффективность (вызвать гипо- или гиперпотенцию или изменить биораспределение и клиренс лекарственного средства в организме), изменить фармакокинетику лекарственного средства, сделать продукт несовместимым или сделать биопроцесс несовместимым.

Отзывы FDA инъекционных лекарственных средств предполагают, что твердые частицы являются одной из основных причин отзыва лекарственных средств (см. Фиг. 5). С 2008 по 2012 годы присутствие видимых частиц составляло 22% отзывов среди стерильных инъекционных лекарственных средств (см. Фиг. 6).

Регулирующие органы требуют, чтобы анализ лекарственного средства на твердые частицы включал анализ видимых и невидимых частиц как часть характеристики продукта и контроля, а оценка риска должна быть включена для оценки их потенциального воздействия на безопасность и эффективность. Анализы также включают множественные стрессовые условия для оценки склонности к образованию твердых частиц и оценки стабильности. После такого анализа необходимо реализовать стратегии, направленные на минимизацию образования твердых частиц. Для видимых частиц руководство Фармакопеи США (ф. США) по контролю твердых частиц перечисляет (i) требование 100% визуального осмотра в процессе заполнения (ф. США <1> инъекции), (ii) руководство по 100% визуальному осмотру (ф. США <790> видимые частицы в инъекциях) и (iii) описание обучения инспекторов, методов отбора проб и инспекций; подчеркивает жизненный цикл предотвращения/проверки (ф. США <1790> визуальный осмотр инъекций). Фармакопея США (ф. США) также содержит руководство по контролю твердых частиц для невидимых частиц, таких как: (i) пределы для невидимых частиц (частицы ≥ 10 мкм ≤ 25 на мл; частицы ≥ 25 мкм ≤ 3 на мл) и рекомендация двух методов, затемнения света и микроскопии, для подсчета частиц (ф. США <788> Твердые частицы в инъекциях), (ii) особые требования к биологическим препаратам и прекращение использования микроскопии для подсчета белковых частиц (ф. США <787> невидимый твердые частицы в инъекциях терапевтических белков) и (iii) методы различения типов частиц; акцент на характеристике белковых частиц (ф. США <1787> Измерение невидимых твердых частиц в инъекциях терапевтических белков). Наконец, в отношении твердых частиц в офтальмологических растворах руководство Фармакопеи США (ф. США) по контролю твердых частиц содержит рекомендации в главах ф. США <789> твердые частицы в офтальмологических растворах и ф. США <1788> Методы

определения твердых частиц в инъекционных и офтальмологических растворах.

Одной из основных проблем при разработке и оценке белковых препаратов является характеристика и количественное определение потенциальных продуктов разложения, особенно агрегатов и частиц (Linda Narhi, Jeremy Schmit & Deepak Sharma, Classification of protein aggregates, 101 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 493-498 (2012)).

В то время как производители приборов работали над предоставлением новых аналитических методов для преодоления аналитического пробела в невидимом диапазоне размеров, существует большая потребность в создании рабочего процесса, который поможет их критической научной оценке.

Учитывая ограничения существующих методов, был разработан эффективный и действенный метод идентификации и характеристики видимых или невидимых частиц в лекарственном препарате.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя в практической реализации или апробации данного изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, сходные или эквивалентные описанным в данном документе, в настоящий момент описаны предпочтительные способы и материалы. Все публикации, процитированные в данном документе, включены в качестве ссылки во всей их полноте.

Формы единственного числа следует понимать, как означающие «по меньшей мере один»; и термины «около» и «приблизительно» следует понимать, как допускающие стандартные вариации, как будет понятно специалистам в данной области техники; а если указаны диапазоны, то включены конечные точки.

В некоторых примерных вариантах реализации, в данном изобретении предлагается способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце.

Термин «белок», в контексте данного документа, включает любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или более полимерных цепей аминокислот, обычно известных в данной области как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и его синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов. «Синтетические пептиды или полипептиды» относятся к не встречающемуся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные методы твердофазного пептидного синтеза. Белок может содержать один или более полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. Белок может включать любой из

биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, используемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других слитых белков химерного рецептора, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, антител человека и биспецифических антител. В другом иллюстративном аспекте белок может включать фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как бакуловиральная система в клетках насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Для обзора обсуждающих биотерапевтических белков и их производства, см. Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (BIOTECHNOL. GENET. ENG. REV. 147-175 (2012)). В некоторых иллюстративных вариантах реализации, белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Эти модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминную кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, белок FLAGtag, мальтозосвязывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), мус-эпитоп, флуоресцентные метки и другие красители и т.п. Белки могут быть классифицированы на основе состава и растворимости и, таким образом, могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и фиброзные белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белков, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации, белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, белок клетки-хозяина или их комбинации.

Термин «антитело», в контексте данного документа, включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (сокращенно в данном документе HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно в данном документе LCVR или V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен ($C_{sub.L1}$). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гиперпеременности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца до карбокси-конца в следующем

порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных иллюстративных вариантах реализации, FR антитела анти-big-ET-1 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Термин «антитело», в контексте данного документа, также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полноразмерного антитела.

Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генно-инженерный полипептид, или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полноразмерного антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для организации одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот, и так далее.

Термин «фрагмент антитела», в контексте данного документа, включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fc, фрагмент scFv, фрагмент Fv, димер dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), а также триател, тетраател, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. Фрагмент антитела может быть получен различными способами. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативно или химически путем фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантно из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Альтернативно или дополнительно, фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать фрагмент

одноцепочечного антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс.

Термин «моноклональное антитело», в контексте данного документа, не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любыми способами, доступными или известными в данной области техники. Моноклональные антитела, применимые в соответствии с настоящим описанием, могут быть получены с использованием широкого разнообразия методик, известных в данной области техники, включая использование гибридных, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

Используемый в данном документе термин «белок клетки-хозяина» включает белок, экспрессируемый клеткой-хозяином, и может не иметь отношения к желаемому представляющему интерес белку. Белок клетки-хозяина может быть технологической примесью, которая может быть получена в процессе производства и может включать три основные категории: производное клеточного субстрата, полученное из культуры клеток и полученное ниже по потоку. Примеси, происходящие из клеточного субстрата, включают, но не ограничиваются ими, белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномная, векторная или общая ДНК клетки-хозяина). Примеси, полученные из клеточных культур, включают, но не ограничиваются ими, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, полученные ниже по потоку, включают, но не ограничиваются ими, ферменты, химические и биохимические обрабатывающие реагенты (например, цианогенбромид, гуанидин, окислители и восстановители), неорганические соли (например, тяжелые металлы, мышьяк, неметаллические ионы), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие удаляемые вымыванием вещества.

В некоторых примерных вариантах реализации, по меньшей мере одна видимая или невидимая частица может содержать технологическую примесь.

В некоторых примерных вариантах реализации, по меньшей мере одна видимая или невидимая частица может содержать примесь, связанную с продуктом.

Используемый в данном документе термин «примеси, связанные с продуктом» (например, предшественники, определенные продукты разложения), могут быть молекулярными вариантами, возникающими во время производства и/или хранения, которые не обладают свойствами, сравнимыми со свойствами желаемого продукта в отношении активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут потребовать значительных усилий по выделению и описанию, чтобы идентифицировать тип модификации (модификаций). Примеси, связанные с продуктом, могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются гидролитическими ферментами или химическими веществами, которые катализируют

расщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают, но не ограничиваются ими, дезамидированные, изомеризованные, несоответствующие SS-связанные, окисленные или измененные конъюгированные формы (например, гликозилированием, фосфорилированием). Модифицированные формы могут также включать любую форму посттрансляционной модификации. Агрегаты включают димеры и образования более высокого порядка желаемого продукта. (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept. of Health and Humans Services).

В некоторых примерных вариантах реализации, видимая или невидимая частица могут может содержать агрегат белка. Используемый в данном документе термин «агрегат белка» относится к ансамблям мономеров белка, которые могут различаться по размеру, восстановлению и структуре. Некоторые механизмы образования агрегата белка продемонстрированы на Фиг. 4.

Используемый в данном документе термин «состав» относится к активному фармацевтическому веществу, которое составлено вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями.

Используемый в данном документе термин «активное фармацевтическое вещество» может включать биологически активный компонент лекарственного средства. Активное фармацевтическое вещество может относиться к любому веществу или комбинации веществ, используемых в лекарственном средстве, которое предназначено для обеспечения фармакологической активности или иным образом оказывать прямое действие при диагностике, лечении, смягчении, лечении или профилактике заболевания, или оказывать прямое действие в восстановлении, исправлении или изменении физиологических функций животных. Неограничивающие способы получения активного фармацевтического вещества могут включать использование процесса ферментации, рекомбинантной ДНК, выделение и извлечение из природных ресурсов, химический синтез или их комбинации.

В некоторых примерных вариантах реализации, указанный состав может представлять собой белковый препарат.

Используемый в данном документе термин «белковый препарат» относится к терапевтическому белку, который составлен вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах реализации, терапевтический белок присутствует в количестве стандартной дозы, подходящем для введения в схеме лечения.

В некоторых других вариантах реализации, состав может дополнительно содержать вспомогательные вещества, включая, но не ограничиваясь ими, буферные агенты, наполнители, модификаторы тоничности, поверхностно-активные вещества, солюбилизующие агенты и консерванты. Другие дополнительные вспомогательные вещества также могут быть выбраны на основе функции и совместимости с составами, которые можно найти, например, в Loyd V. Allen, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (19 ed. 1995), JOHN E HOOVER, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (1975)

и LYOD ALLEN, ANSEL'S PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS (10 ed.), включенных в данный документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

В некоторых примерных вариантах реализации, указанный состав может быть стабильным.

Стабильность состава может включать оценку химической стабильности, физической стабильности или функциональной стабильности активного фармацевтического вещества. Составы в соответствии с данным изобретением обычно демонстрируют высокие уровни стабильности активного фармацевтического вещества.

В отношении белковых препаратов термин «стабильный», в контексте данного документа, относится к белкам в составах, которые могут сохранять приемлемую степень химической структуры или биологической функции после хранения в примерных условиях, описанных в данном документе. Состав может быть стабильным, даже если содержащийся в нем белок не сохраняет 100% своей химической структуры или биологической функции после хранения в течение определенного периода времени. При определенных обстоятельствах сохранение около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% структуры или функции белка после хранения в течение определенного времени может рассматриваться как «стабильное».

В некоторых примерных вариантах реализации, частицы жирных кислот могут иметь размер по меньшей мере 5 мкм. Кроме того, эти частицы жирных кислот можно разделить по размеру на видимые (> 100 мкм), невидимые (< 100 мкм, которые можно подразделить на микронные (1-100 мкм) и субмикронные (100 нм - 1000 нм)) и наномерные частицы (< 100 нм) (Linda Narhi, Jeremy Schmit & Deepak Sharma, Classification of protein aggregates, 101 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 493-498 (2012)).

В некоторых примерных вариантах реализации, частицы могут быть обнаружены как белок с помощью рамановской спектроскопии. Используемый в данном документе термин «рамановская спектроскопия» относится к спектроскопическому методу, основанному на методе комбинационного рассеяния света. Рамановская спектроскопия может предоставить рамановский спектр, который может идентифицировать присутствие и положение полос в области отпечатка пальца (от 2000 до 400 cm^{-1}), что позволяет провести химическую идентификацию анализируемого материала путем сравнения с базой данных рамановских спектров (C. V. Raman and K. S. Krishnan, A new type of secondary radiation, 121 NATURE 501-502 (1928); Zai-Qing Wen, Raman spectroscopy of protein pharmaceuticals, 96 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2861-287 (2007)).

Как используется в данном документе, термин «хроматография» относится к процессу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью или газом может быть разделена на компоненты в результате дифференциального распределения химических объектов, как они переносятся вокруг или над неподвижной жидкостью или твердой фазой. Неограничивающие примеры хроматографии включают традиционную обращено-

фазовую (ОФ), ионообменную (ИО) и нормально-фазовую хроматографию (НФ). В отличие от ОФ, НФ и ИО хроматографии, в которых гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие и ионное взаимодействие, соответственно, являются доминирующими режимами взаимодействия, хроматография в смешанном режиме может использовать комбинацию двух или более из этих режимов взаимодействия.

Используемый в данном документе термин «масс-спектрометр» включает устройство, способное идентифицировать определенные молекулярные виды и точно измерять их массы. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в который можно элюировать полипептид или пептид для обнаружения и/или характеристики. Масс-спектрометр может включать три основные части: источник ионов, масс-анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры аналита могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы одновременно (как при ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов сильно зависит от области применения.

Используемый в данном документе термин «масс-анализатор» включает устройство, которое может разделять частицы, то есть атомы, молекулы или кластеры, в соответствии с их массой. Неограничивающими примерами масс-анализаторов, которые можно использовать для быстрого секвенирования белков, являются времяпролетные (TOF), с магнитным/электрическим сектором, с квадрупольным масс-фильтром (Q), с квадрупольной ионной ловушкой (QIT), с орбитальной ловушкой, с ионно-циклотронным резонансом с преобразованием Фурье (FTICR), а также с методом ускорительной масс-спектрометрии (AMS).

Используемый в данном документе термин «тандемная масс-спектрометрия» включает метод, в котором структурная информация о молекулах образца получается с использованием нескольких стадий массового отбора и разделения масс. Предварительным условием является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в неизменном виде, и что их можно заставить распадаться некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первой стадии массового отбора. Многоступенчатая МС/МС, или MS^n , может быть выполнена сначала путем отбора и выделения иона-предшественника (MS^2), его фрагментирования, выделения иона первичного фрагмента (MS^3), его фрагментирования, выделения вторичного фрагмента (MS^4) и т. д. до тех пор, пока можно получить значимую информацию или детектировать ионный сигнал фрагмента. Тандемная МС успешно проводилась с широким спектром комбинаций анализаторов. Какие анализаторы комбинировать для определенного приложения, может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размером, стоимостью и доступностью. Двумя основными категориями тандемных методов МС являются тандемвпространстве и тандемвовремени, но есть также гибридные категории, когда тандемвовремени анализаторы соединяются в пространстве или с тандемвпространстве анализаторами. Тандемныйвпространстве масс-спектрометр включает источник ионов,

устройство активации ионов-прекурсоров и по меньшей мере два масс-анализатора без захвата. Конкретные функции разделения m/z могут быть спроектированы так, чтобы в одной секции прибора ионы выбирались, диссоциировали в промежуточной области, а ионы продукта затем передавались в другой анализатор для разделения m/z и сбора данных. В тандемном режиме масс-спектрометре ионы, произведенные в источнике ионов, могут быть захвачены, изолированы, фрагментированы и разделены по соотношению m/z в одном и том же физическом устройстве.

Пептиды, идентифицированные масс-спектрометром, можно использовать в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно использовать для характеристики белков путем сопоставления экспериментальных и теоретических данных МС/МС, последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Характеристика включает, но не ограничивается, секвенирование аминокислот фрагментов белка, определение секвенирования белка, определение секвенирования белка *de novo*, определение местоположения посттрансляционных модификаций или идентификацию посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

Используемый в данном документе термин «база данных» относится к инструментам биоинформатики, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров МС-МС по всем возможным последовательностям в базе(ах) данных. Неограничивающими примерами таких баз данных являются Mascot (<http://www.matrixscience.com>), Spectrum Mill (<http://www.chem.agilent.com>), PLGS (<http://www.waters.com>), PEAKS (<http://www.bioinformaticssolutions.com>), ProteinPilot (<http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot>), Phenyx (<http://www.phenyx-ms.com>), Sorcerer (<http://www.sagenresearch.com>), OMSSA (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/>), X!Tandem (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>), Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>) или Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

Примерные варианты реализации

В раскрытых в данном документе вариантах реализации предлагаются композиции, способы и системы для быстрой характеристики белков в образце.

В некоторых примерных вариантах реализации, в данном изобретении предлагается способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце, включающий обнаружение по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце, выделение и захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для определения присутствия белка, и использование масс-спектрометра для характеристики белка.

В некоторых примерных вариантах реализации, в данном изобретении предлагается способ для идентификации белка по меньшей мере в одной видимой или

невидимой частице в образце, включающий обнаружение по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце, выделение и захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для определения присутствия белка, и использование масс-спектрометра для характеристики белка.

В некоторых примерных вариантах реализации, в данном изобретении предлагается способ для идентификации белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце, включающий обнаружение по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце, выделение и захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для определения присутствия белка, и использование масс-спектрометра для характеристики белка с целью определить, является ли белок белком клетки-хозяина.

В некоторых примерных вариантах реализации, рамановская спектроскопия света может быть использована для идентификации присутствия белка по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы.

В некоторых примерных вариантах реализации по меньшей мере одна видимая или невидимая частица могут иметь размер, по меньшей мере, около 2 мкм. В одном аспекте, по меньшей мере одна видимая или невидимая частица могут иметь размер, по меньшей мере около 2 мкм, по меньшей мере около 3 мкм, по меньшей мере около 4 мкм, по меньшей мере около 5 мкм, по меньшей мере, приблизительно 6 мкм, по меньшей мере около 7 мкм, по меньшей мере около 8 мкм, по меньшей мере около 9 мкм, по меньшей мере около 10 мкм, по меньшей мере около 11 мкм, по меньшей мере около 12 мкм, по меньшей мере около 13 мкм, по меньшей мере около 14 мкм, по меньшей мере около 15 мкм, по меньшей мере около 20 мкм, по меньшей мере около 25 мкм, по меньшей мере около 30 мкм, по меньшей мере около 35 мкм, по меньшей мере около 40 мкм, по меньшей мере около 45 мкм, по меньшей мере около 50 мкм, по меньшей мере около 55 мкм, по меньшей мере около 60 мкм, по меньшей мере около 65 мкм, по меньшей мере около 70 мкм, по меньшей мере около 75 мкм, по меньшей мере около 80 мкм, по меньшей мере около 85 мкм, по меньшей мере около 90 мкм, по меньшей мере около 95 мкм, или по меньшей мере около 100 мкм.

В некоторых примерных вариантах реализации, белок может быть изначальной примесью.

В некоторых примерных вариантах реализации, по меньшей мере одна видимая или невидимая частица могут быть захвачены на поликарбонатной мембране с золотым покрытием. В некоторых примерных вариантах реализации поликарбонатная мембрана с золотым покрытием может иметь размер пор около 5 мкм.

В некоторых примерных вариантах реализации, по меньшей мере одна видимая или невидимая частица могут быть захвачены на фильтровальной бумаге. В некоторых примерных вариантах реализации, фильтровальная бумага может иметь размер пор около 5 мкм.

В некоторых примерных вариантах реализации, способ может дополнительно

включать вырезание части поликарбонатной мембраны с золотым покрытием или бумажного фильтра, используемых для захвата по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы.

В некоторых примерных вариантах реализации способ может дополнительно включать растворение образца в мочеvine после идентификации присутствия белка или белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице. В одном аспекте, образец может быть растворен в 8 М растворе мочеvine.

В некоторых примерных вариантах реализации, способ может дополнительно включать денатурацию образца в денатурирующих условиях после идентификации присутствия белка или белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице. В одном аспекте образец может быть денатурирован с помощью дитиотреитола при подходящей температуре.

В некоторых примерных вариантах реализации, способ может дополнительно включать расщепление образца в денатурирующих условиях после идентификации присутствия белка или белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице. В одном аспекте, образец может быть расщеплен с использованием гидролизующего агента. Неограничивающие пример гидролизующих агентов, которые могут осуществлять ферментативное расщепление включают трипсин, эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C, протеазу T внешней мембраны (OmpT), разрушающий иммуноглобулин фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназу и протеазу из *Aspergillus Saitoi*. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают использование высокой температуры, микроволн, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения, растворителей (неограничивающими примерами являются этанол и ацетонитрил), расщепление иммобилизованными ферментами (IMER), ферментами, иммобилизованными на магнитных частицах, и ферментами, иммобилизованными на чипе. Недавний обзор, в котором обсуждаются доступные методы переваривания белков, см. Switazar et al., "Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments" (J. Proteome Research 2013, 12, 1067-1077). Один или комбинация гидролизующих агентов может расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде специфическим для последовательности образом, создавая предсказуемую коллекцию более коротких пептидов.

В некоторых примерных вариантах реализации, образец может дополнительно содержать представляющий интерес белок. В одном аспекте интересующий белок может представлять собой терапевтическое антитело, антитело, моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, гибридный белок или их комбинацию.

В одном иллюстративном варианте реализации изобретения белок или белок, клетки-хозяина могут быть посттрансляционно модифицированным представляющим

интерес белком. Различные посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются ими, расщепление, удлинение N-конца, деградацию белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование остатков лизина биотином), амидирование C-конца, гликозилирование, йодирование, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование (добавление ацетильной группы, обычно на N-конце белка), алкилирование (добавление алкильной группы (например, метила, этила, пропила) обычно по лизину или аргинину остатков), метилирование, аденилирование, АДФ-рибозилирование, ковалентные поперечные связи внутри или между полипептидными цепями, сульфирование, пренилирование, зависящие от витамина С модификации (гидроксилирование пролина и лизина и амидирование карбоксильного конца), зависящую от витамина К модификацию, где витамин К представляет собой кофактор карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты, приводящий к образованию γ -карбоксиглутамата (остаток glu), глутамилирование (ковалентное связывание остатков глутаминовой кислоты), глицирование (ковалентная связывание остатков глицина), гликозилирование (добавление гликозильной группы к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, приводящее к гликопротеину), изопренилирование (добавление изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липоилирование (присоединение липоатной функциональности), фосфопантетеинилирование (добавление 4'-фосфопантетеинильного фрагмента из кофермента А, как в жирной кислоте, поликетиде, нерибосомном пептиде и биосинтезе лейцина), фосфорилирование (добавление фосфатной группы, обычно по серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфатирование (добавление сульфатной группы, обычно по остатку тирозина). Посттрансляционные модификации, которые изменяют химическую природу аминокислот, включают, но не ограничиваются ими, цитруллинирование (превращение аргинина в цитруллин путем деиминирования) и дезамидирование (превращение глутамина в глутаминовую кислоту или аспарагина в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, которые включают структурные изменения, включают, но не ограничиваются ими, образование дисульфидных мостиков (ковалентное связывание двух аминокислот цистеина) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). Некоторые посттрансляционные модификации включают добавление других белков или пептидов, таких как ISGylation (ковалентная связь с белком ISG15 (ген, стимулированный интерфероном)), SUMOилирование (ковалентная связь с белком SUMO (Малый убиквитин-подобный модификатор)) и убиквитинирование (ковалентная связь с белком убиквитином). См. <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> для более подробного курируемого UniProt словаря ПТМ.

В другом примерном варианте реализации образец может быть получен на любой стадии биопроцесса, например, из жидкости для культивирования клеток (CCF), из жидкости для культивирования собранных клеток (HCCF), на стадии оценки эффективности процесса (PPQ), на любой стадии ниже по потоку от стадии обработки, из раствора лекарственного средства (РЛК) или лекарственного средства (ЛС), содержащего

конечный составленный продукт. В некоторых других конкретных примерных вариантах реализации, образец может быть выбран из любой стадии ниже по потоку от стадии очистки, хроматографической очистки, инактивации вирусов или фильтрации. В одном аспекте лекарственный продукт может быть выбран из лекарственного продукта, произведенного в клинике, при транспортировке, хранении или транспортировке.

В некоторых примерных вариантах реализации масс-спектрометр может быть соединен с жидкостной хроматографией. В одном аспекте, масс-спектрометр может быть соединен с нано-жидкостной хроматографией. В некоторых примерных вариантах реализации, подвижная фаза используемая для элюирования белка в жидкостной хроматографии может быть подвижной фазой, которая может быть совместимой с помощью масс-спектрометра. В одном аспекте, указанная подвижная фаза может быть ацетатом аммония, бикарбонатом аммония или формиатом аммония, или их комбинациями.

В другом примерном варианте реализации, указанный масс-спектрометр может включать наноспрей.

В некоторых примерных вариантах реализации масс-спектрометр может являть собой tandemный масс-спектрометр для характеристики белка.

В некоторых примерных вариантах реализации белок или белок клетки-хозяина может представлять собой терапевтическое антитело, антитело, моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, гибридный белок или их комбинации. В одном аспекте, указанный фрагмент антитела может включать фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), триатела, тетратела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

В некоторых примерных вариантах реализации белок или белок клетки-хозяина может быть продуктом расщепления антитела. Продукт расщепления может быть образован гидролизующим агентом. Продукт расщепления может быть примесью, связанной с продуктом.

В некоторых примерных вариантах реализации, белок или белок клетки-хозяина может иметь pI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном примерном специфическом варианте реализации, белок может быть белком с pI около 4,5, около 5,0, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1, около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9, около 8,0, около 8,1, около 8,2, около 8,3, около 8,4, около 8,5, около 8,6, около 8,7, около 8,8, около 8,9 или около 9,0.

В одном примерном варианте реализации, количество видимых или невидимых частиц в образце может быть равным по меньшей мере два.

В одном примерном варианте реализации, количество типов белка или белка клетки-хозяина в образце может быть равным по меньшей мере два.

Следует понимать, что способы не ограничены каким-либо из указанного выше белка, примеси, колонки, и что способы идентификации или количественной оценки могут быть проведены с помощью любых подходящих средств.

В некоторых примерных вариантах реализации, изобретение предлагает способ, включающий осмотр частиц **100**, выделение частиц **110**, захват **120** частиц и масс-спектрометр **140**, соединенный с хроматографической колонкой **130** (см. Фиг. 7).

В некоторых примерных вариантах реализации, способ может дополнительно включать спектроскопии комбинационного рассеяния света **150** способную идентифицировать присутствие белка.

В некоторых примерных вариантах реализации проверка частиц **100** может выполняться путем визуального осмотра, затемнения света или получения изображения микропотока. В одном примерном варианте реализации проверка частиц может быть выполнена посредством визуального контроля, ИК Фурье-спектроскопии, рамановской спектроскопии или визуализации микропотока (MFI).

В некоторых примерных вариантах реализации выделение частиц **110** и улавливание частиц **120** могут выполняться с использованием фильтрующих устройств.

В некоторых примерных вариантах реализации указанная хроматографическая колонка **130** может быть промыта подвижной фазой. В одном примерном варианте реализации, указанная подвижная фаза может быть ацетатом аммония, бикарбонатом аммония или формиатом аммония или их комбинациями.

В некоторых примерных вариантах реализации масс-спектрометр **140** может иметь наноспрей.

В некоторых примерных вариантах реализации масс-спектрометр **140** может являть собой tandemный масс-спектрометр. В одном примерном варианте реализации масс-спектрометр **140** может быть tandemным в пространстве масс-спектрометром. В одном примерном варианте реализации масс-спектрометр **140** может быть tandemным во времени масс-спектрометром.

Примерный вариант реализации системы, показан на Фиг. 8.

Понятно, что система не ограничивается каким-либо из вышеупомянутых белков, белков клетки-хозяина, способов спектроскопии или хроматографической колонки.

Последовательная маркировка стадий способа, как указано в данном документе, номерами и/или буквами не предназначена для ограничения способа или любых его вариантов конкретным указанным порядком.

Различные ссылки, включая патенты, патентные заявки, опубликованные патентные заявки, инвентарные номера, технические статьи и научные статьи цитируются по всему документу. Каждый источник включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте и для любых целей.

Раскрытие будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры, которые

предоставлены для более подробного описания раскрытия. Они предназначены для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие объем раскрытия.

ПРИМЕРЫ

Пример 1.

1.1 Обнаружение частиц

При оценке флаконов в партии оценки рабочих характеристик процесса (PPQ) (партия № 1), содержащей композицию mAb1, около 264 флаконов (~ 4,5%) партии PPQ содержали видимые частицы. Поскольку допустимый предел для партии PPQ составляет 0,7%, партия была отклонена.

Партию PPQ оценивали на наличие уровня полисорбата, который был признан нормальным.

Частица (частица 1) из партии PPQ улавливалась серым фильтром (см. Фиг. 9).

1.2 Выделение частицы

На фильтровальной бумаге были сделаны вырезы: (а) область разреза 1-область 4 мм x 4 мм, на которую загружали частицу 1, (b) область разреза 2-область размером 4 мм x 4 мм, на которую загружали раствор белка, и (с) область разреза 3-область 4 мм x 4 мм, на которую не загружали белок (см. фиг. 10). Область разреза/образцы растворяли в 8 М мочеvine.

Образцы инкубировали с 8 М мочевиной и 5 мМ дитиотрептолом (DTT) при 50°C в течение 30 минут с последующей инкубацией с 10 мМ индол-3-уксусной кислотой (IAA) при комнатной температуре в течение 30 минут. Образцы инкубата обрабатывали 1 мкг rLysC в течение 1 часа в денатурирующих условиях с последующим разбавлением Трис-HCl. К этой смеси добавляли 1 мкг трипсина и продолжали расщепление в течение 3 часов. Затем расщепленную смесь подкисляли 20% муравьиной кислотой (МК) с последующим анализом нано-ЖХ-МС/МС.

1.3 Пептидный анализ

Для определения состава частицы 1 был проведен пептидный анализ частицы 1 с использованием наноЖХ-МС/МС Thermo EASY-nLC, соединенного с масс-спектрометром Thermo QExactive HF. Для идентификации присутствующих белков, использовали программное обеспечение Proteome Discoverer v. 1.4, использующее режим Sequest, для поиска масс-спектральных данных по базе данных последовательностей белков СНО. Показатели качества пептидов были получены путем обработки в базе данных-ловушке с использованием узла Peptide Validator в Proteome Discoverer, который вычисляет вероятность того, что алгоритм поиска неправильно включил пептид в образец. Частота ложных обнаружений (FDR), или частота ложных срабатываний, представляет собой статистическое значение, которое оценивает количество ложноположительных идентификаций среди всех идентификаций, найденных при поиске идентификации пептидов. Пептиды, оцененные с менее чем 5% FDR (пептиды со средней и высокой степенью достоверности), были сохранены, а те, которые оценивались с порогом FDR менее 1% (высокая степень достоверности), были отмечены как с высокой степенью

достоверности. Для положительной идентификации каждого НСР требовалось минимум два (проходных) пептида со средней или высокой степенью достоверности на белок. Спектры МС/МС пептидов для тех белков, которые были идентифицированы только одним пептидом с высокой степенью достоверности, исследовали вручную на охват трех или более последовательных b- и y-ионов и низкого количества избыточных посторонних ионов для определения их приемлемости.

Все образцы были проанализированы на содержание mAb1. Область разреза 1 (содержащая частицу 1) показала высокое содержание белка mAb1, за которым следовало некоторое присутствие mAb1 в области разреза 2 (раствор белка без частицы 1), а область разреза 3 показала низкий уровень/отсутствие белка mAb1 (см. Фиг. 11).

Было обнаружено, что белок клетки-хозяина, отличный от mAb1-TIMP1, присутствует в частице 1 (Таблица 1). Однако TIMP1 не присутствовал в растворе белка без частицы 1, что указывает на то, что частица была им обогащена.

Таблица 1

Образцы	Идентификатор белка	Описание	Количество идентифицированных уникальных пептидов
Область разреза 1 (частица)	mAb1	НС	37
	mAb1	LC	22
	TIMP1	Ингибитор металлопротеиназы 1 UniProt ID: P01033	4
Область разреза 2 (загрузка белка)	mAb1	НС	31
	mAb1	LC	16
Область разреза 3 (отрицательный контроль)	mAb1	НС	22
	mAb1	LC	11

Пример 2.

Четыре дополнительных частицы (частицы 2-5) были идентифицированы в партии PPQ (партия № 1), содержащей композицию из mAb1. Эти частицы были захвачены и проанализированы.

2.1 Выделение частицы

Каждую обнаруженную частицу помещали на индивидуальную Rap ID покрытую золотом поликарбонатную мембрану с размером пор 5 мкм и покрытием 40/20 нм, как показано на Фиг. 12.

На мембранах делали иссечения, чтобы изолировать частицу от белкового раствора, как показано в примере 1.

2.2 Рамановский анализ

Для идентификации составляющих частиц использовали рамановскую спектроскопию. В этом способе используется неупругое рассеяние света для создания энергетического спектра, уникального для каждой молекулы, который затем сравнивается с эталонной библиотекой, содержащей «отпечатки пальцев» различных химических структур. Рамановский анализ подтвердил, что все четыре частицы (частица 2, 3, 4 и 5) содержат белок. Освещение в темном поле показало, что частицы, окружающие области, не имеют или имеют очень минимальные уровни белковых сигналов, что гарантирует, что срезанные частицы из фильтра не вызывают загрязнения для анализа МС (см. Фиг. 13).

2.3 Пептидный анализ

Для определения состава частиц, был проведен пептидный анализ частицы с использованием наноЖХ-МС/МС, как представлено в примере 1. В Таблице 2 перечислены белки клетки-хозяина, идентифицированные в частице с 1 по 5, вместе с партией раствора лекарственного средства (DS), все из которых содержат mAb1. Белки клетки-хозяина подвергали скринингу с помощью обычной наноЖХ-МС/МС и подтверждали их наличие с помощью направленной наноЖХ-МС/МС. Частицы 3 и 4 были меньше по размеру и содержали в около 10-50 раз меньшее количество белка, чем частица 1 и частица 5, что, вероятно, объясняет результат меньшего количества идентифицируемых белков клетки-хозяина.

Таблица 2

Идентификатор белка	Описание	Идентифицированные белки					
		DS	P1	P2	P3	P4	P5
mAb1	HC	Да	Да	Да	Да	Да	Да
mAb1	LC	Да	Да	Да	Да	Да	Да
TIMP1	Ингибитор металлопротеиназы 1 ID UniProt: P01033	Нет	Да	Да	Нет	Нет	Да
PP1B	Пептидилпролилцис-транс-изомераза В UniProt ID: P23284	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Да
ITIH5	Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина H5 ID UniProt: Q86UX2	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Да

PPIC	Пептидил-пролил цис-транс-изомераза C ID UniProt: P45877	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Да
ALDOA	Фруктозо-бисфосфатальдолаза A ID UniProt: P04075	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Да
ANXA1	Аннексин A1 ID UniProt: P04083	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Да
CFL1	Кофилин-1 ID UniProt: P23528	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Нет
PTGR1	Простагландин редуктаза 1 ID UniProt: F5GY50	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Нет
CCL13	Хемокин 13 с мотивом C-C ID UniProt: Q99616	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Да
S100-A11	Белок S100-A11 ID UniProt: P31949	Нет	Нет	Да	Нет	Нет	Нет

Исследование подтвердило присутствие белков клетки-хозяина в выделенной частице отклоненного mAb1, партия № 1.

Пример 3

Чтобы изучить, были ли видимые частицы обогащены белками клетки-хозяина в других партиях, содержащих композицию mAb1, оценивали частицы в клинической партии, содержащей композицию mAb1 (партия № 2), и две другие партии PPQ, содержащие композицию mAb1 (партии № 3 и 4).

Выделение частиц, рамановский анализ и пептидный анализ выполняли, как описано в Примере 2.

В Таблице 3 перечислены белки клетки-хозяина, идентифицированные в частицах из партии № 1 (партия PPQ), партии № 2 (клиническая партия), партии № 3 (партия PPQ) и партии № 4 (партия PPQ). Белки клетки-хозяина подвергали скринингу с помощью обычной наноЖХ-МС/МС и подтверждали их наличие с помощью направленной

наноЖХ-МС/МС. Некоторые белки клетки-хозяина не были идентифицированы при первоначальном скрининге, но были идентифицированы с помощью подтверждающих анализов. Частицы в партии № 2 (клиническая партия) были меньше по размеру и содержали в около 15-30 раз меньше белка, чем частицы из партии № 4 (партия PPQ), что, вероятно, объясняет результат меньшего количества идентифицируемых белков клетки-хозяина. Сравнение белков клетки-хозяина, идентифицированных как присутствующие в частицах из этих партий 2-4, позволяет предположить, что белки, идентифицированные в видимых частицах, выделенных из партии № 1 сопоставимы.

Таблица 3.

Идентификатор белка	Описание	Выявлено				Подтверждено			
		Партия №				Партия №			
		1	2	3	4	1	2	3	4
mAb1	Тяжелая цепь	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
mAb1	Легкая цепь	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
TIMP1	Ингибитор металлопротеиназы 1 ID UniProt: P01033	Да	Не т	Не т	Да	Да	Не т	Не т	Да
PP1B	Пептидилпролилцис- транс-изомераза В UniProt ID: P23284	Да	Не т	Не т	Да	Да	Да	Не т	Да
ITIH5	Тяжелая цепь ингибитора интер- альфа-трипсина H5 ID UniProt: Q86UX2	Да	Не т	Не т	Да	Да	Не т	Не т	Да
PP1C	Пептидилпролилцис- транс-изомераза С UniProt ID: P45877	Да	Не т	Не т	Да	Да	Не т	Не т	Да
ALDOA	Фруктозо- бисфосфатальдолаза А UniProt ID: P04075	Да	Не т	Не т	Да	Да	Не т	Не т	Да

ANXA1	Аннексин А1 ID UniProt: P04083	Да	Не т	Не т	Да	Да	Не т	Не т	Да
CFL1	Кофилин-1 ID UniProt: P23528	Да	Не т	Не т	Не т	Да	Не т	Не т	Да
CCL13	Хемокин 13 с мотивом С-С ID UniProt: Q99616	Да	Не т	Не т	Да	Да	Да	Не т	Да
S100-A11	Белок S100-A11 ID UniProt: P31949	Да	Не т	Не т	Не т	Да	Не т	Не т	Да
ANXA2	Аннексин А2 ID UniProt: H0YMU9	Не т	Не т	Не т	Да	-	Да	Да	Да
AK2	Аденилаткиназа 2, митохондриальная "UniProt ID: P54819	Не т	Не т	Не т	Да	-	Не т	Не т	Да
ST3GAL1	СМР-N- ацетилнейраминат-бета- галактозамид-альфа-2,3- сиалилтрансфераза 1" UniProt ID: Q11201	Не т	Не т	Не т	Да	-	Не т	Не т	Да
GSTM2	Глутатион S- трансфераза Mu 2 ID UniProt: P28161	Не т	Не т	Не т	Да	-	Не т	Не т	Да

Пример 4

Чтобы изучить, обогащен ли раствор лекарственного средства mAb1, который может составлять партии PPQ, белками клетки-хозяина, изучали партии раствора лекарственного средства (партии № 5-12).

4.1 Уровни PLBD2

Раствор лекарственного средства был протестирован на PLBD2 с использованием способа ЛС-МС MRM с использованием набора ИФА для предполагаемой фосфолипазы

В-типа 2 хомяка (PLBD2), каталог CSB-EL018125Ha от CUSABIO. Этот набор утверждает, что обеспечивает количественное определение предполагаемых концентраций фосфолипазы В-типа (PLBD2) хомяка. Была построена стандартная кривая, показывающая обнаружение стандарта PLBL2 хомяка, включенного в набор, в диапазоне 0,12-8 нг/мл. Раствор лекарственного средства из партии № 5-12 продемонстрировал уровень PLBD2 ниже нижнего предела количественного определения (1 м.д., т.е. 1 нг PLBD в 1 мг mAb1).

Таким образом, раствор лекарственного средства во всех вышеупомянутых партиях показал отсутствие аномальных уровней PLBD2.

4.2 Профилирование НСР с использованием прямого пептидного картирования

Чтобы узнать состав раствора лекарственного средства, был проведен пептидный анализ с использованием наноЖХ-МС/МС, как описано в примере 1. Белки клетки-хозяина подвергали скринингу с помощью обычной наноЖХ-МС/МС и подтверждали их наличие с помощью направленной наноЖХ-МС/МС. Белки клетки-хозяина не были идентифицированы ни в одной из протестированных партий (партии № 5-12) (Таблица 4). TIMP1 и CCL13 не были идентифицированы при первоначальном скрининге всех партий, но с помощью более чувствительных подтверждающих анализов было обнаружено, что они присутствуют во всех партиях. Относительное содержание белков клетки-хозяина TIMP1 и CCL13 в растворах лекарственных средств из партий 5-12 наносили на график как нормализованное к относительному содержанию в партии № 5 (см. Фиг. 14 и 15).

Среди восьми партий, партии №9 и №11 содержали растворы лекарственных средств, использованные для приготовления партий PPQ 1 и 3, соответственно. Для белков клетки-хозяина в растворах лекарственных средств в партиях № 9 и 11, по сравнению с партиями PPQ, для которых они использовались, предполагается, что не было оцениваемых уровней белков клетки-хозяина, наблюдаемых в партии, которая генерировала частицы, по сравнению с другими партиями лекарственного средства.

Таблица 4.

Идентификатор белка	Описание	Идентифицированные белки	Подтвержденные белки
mAb1	Тяжелая цепь	Обнаружено	Обнаружено
mAb1	Легкая цепь		
TIMP1	Ингибитор металлопротеиназы 1 ID UniProt: P01033	Не обнаружено	Обнаружено

CCL13	Хемокин 13 с мотивом C-C ID UniProt: Q99616		
PPIB	Пептидил-пролил цис-транс-изомераза В ID UniProt: P23284		
ITIH5	Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина H5 UniProt ID: Q86UX2		
PPIC	Пептидил-пролил цис-транс-изомераза С ID UniProt: P45877		
ALDOA	Фруктозо-бисфосфатаьдолаза А ID UniProt: P04075		
ANXA1	Аннексин А1 ID UniProt: P04083		Не обнаружено
CFL1	Кофилин-1 ID UniProt: P23528		
PTGR1	Простагландин редуктаза 1 ID UniProt: F5GY50		
S100-A11	Белок S100-A11 ID UniProt: P31949		
ANXA2	Аннексин А2 ID UniProt: H0YMU9		
AK2	Аденилаткиназа 2, митохондриальная" ID UniProt: P54819		

ST3GAL1	СМР-N-ацетилнейраминат-бета-галактозамид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза 1"		
	ID UniProt: Q11201		
GSTM2	Глутатион S-трансфераза Му 2		
	ID UniProt: P28161		

4.3 Профилирование НСР с использованием анти-НСР обогащения иммуноочисткой (IP) с последующим картированием пептидов

Для дальнейшей оценки присутствия белков клетки-хозяина, присутствующих в партиях растворов лекарственного средства, была проведена более чувствительная анти-НСР иммуноочистка. Пул биотинилированных анти-НСР-антител использовали для извлечения и обогащения НСР путем удаления терапевтических белков и других компонентов. После обогащения, НСР затем расщепляли ферментом и вводили с помощью НаноЛС-МС для идентификации и количественного определения НСР. Обогащение позволяет более точно идентифицировать и количественно определять НСР.

В Таблице 5 перечислены белки клетки-хозяина, которые были идентифицированы путем профилирования НСР с использованием обогащения анти-НСР иммуноочисткой.

Таблица 5.

Иден-тифи-катор гена	Белок	Количество совпадений в пептидном спектре для каждой партии								МВт [кДа]	расч . рI
		5	6	7	8	9	10	11	12		
TIMP1	Ингибитор металлопротеиназы 1	33	23	28	28	37	25	32	35	22,4	8,47
GSTM6	Глутатион S-трансфераза Му 6	19	15	28	23	31	24	20	22	86,5	8,21
PP1B	Пептидил-пролил цис-транс-изомераза В	9	7	10	5	8	3	5	4	23,6	9,58
ITIH5	Тяжелая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина H5	5	3	5	8	7	2	7	4	102,0	8,60
CCL13	Хемокин с мотивом C-C	6	5	5	5	5	0	5	7	15,8	9,16

PRDX 1	Пероксиредоксин-1	3	0	6	9	2	5	7	6	22,2	7,72
ANXA 1	Аннексин A1	4	0	6	4	3	2	0	0	38,8	7,02
CXCL 3	Хемокин с мотивом C-X- C	4	0	4	2	3	0	0	2	11,0	8,81
GSTP1	Глутатион S-трансфераза P	2	4	2	2	5	0	0	0	25,0	8,12
DDT	D- допахромдекарбоксилаза	2	2	3	2	2	0	0	2	13,1	7,14
CTSZ	Катепсин Z	0	2	2	3	2	0	0	3	34,0	7,58
SIAE	Сиалат-О-ацетилэстераза	0	0	3	3	2	0	0	2	61,4	8,22
B2M	Бета-2-микроглобулин	0	0	0	0	3	0	0	4	6,39	5,81
C1RA	Подкомпонент комплемента C1r-A	2	0	3	0	0	0	0	0	80,05	6,06
CTSL	Катепсин L1	0	0	2	0	0	0	2	0	37,22	7,17

При сравнение белков клетки-хозяина, идентифицированных в партиях от № 1 (партия PPQ, Таблица 5) до № 9 (партия раствора лекарственного средства, использованного для получения партии № 1, Таблица 3), можно сделать вывод, что никакой уникальный белок клетки-хозяина не связан с партией № 1. Это предполагает, что профиль белка клетки-хозяина в партии PPQ был аналогичен профилю белка клетки-хозяина в партии раствора лекарственного средства.

Пример 5.

Белки клетки-хозяина могут быть обогащены в результате образования агрегатов. Это изучали путем сравнения наличия и уровней белков клетки-хозяина в партии раствора лекарственного средства (партия № 6) с партиями, обогащенными высокомолекулярными видами mAb1, как представлено в таблице 6 ниже.

Таблица 6.

Партия №	Описание образца
6	Контроль DS с помощью mAb1
13	Всего HMW (содержит 93% всего HMW материала mAb1)

14	Димер (содержит 90% димера mAb1)
15	vHMW (содержит 92% vHMW материала mAb1)

Выделение частиц и анализ комбинационного рассеяния для партий 13-15 выполняли, как представлено в Примере 2.

5.1 Белки клетки-хозяина, идентифицированные с помощью прямого пептидного картирования

Образцы были высушены с помощью SpeedVac, а затем растворены в 8 М мочеvine и 10 mM TCEP-HCl и денатурированы при 50°C в течение 30 минут с последующей инкубацией с 10 mM индол-3-уксусной кислотой (IAA) при комнатной температуре в течение 30 минут. Образцы инкубата обрабатывали 1 мкг rLysC в течение 1 часа в денатурирующих условиях с последующим разбавлением Трис-HCl. К этой смеси добавляли 1 мкг трипсина и продолжали расщепление в течение 3 часов. Затем расщепленную смесь подкисляли 20% муравьиной кислотой (МК) с последующим анализом нано-ЖХ-МС/МС. Шесть белков клетки-хозяина были идентифицированы в партии с обогащенными видами HMW mAb1, но не в партии раствора лекарственного средства (Таблица 7).

Таблица 7.

Иденти- фикатор белка	Описание	Выявлено в партии			
		6	13	14	15
TIMP1	Ингибитор металлопротеиназы 1		Да	Да	
GST-Mu 7	Глутатион S-трансфераза Mu7		Да		
PRDX1	Пероксиредоксин		Да	Да	
LDH	L-лактатдегидрогеназа				Да
ANXA1	Аннексин A1		Да		
H2A	Гистон H2A Тип 1			Да	

5.2 Относительное количественное определение белков клетки-хозяина с помощью целевой ЖХ-МС/МС

Идентифицированный пептид/белок из Стадии 5.1 выше использовали для создания списка масс идентифицированных пептидов, чтобы масс-спектрометр искал эти специфические пептиды для фрагментирования для дальнейшего подтверждения и количественной оценки НСР. При этом чувствительность обнаружения была увеличена за счет целевого скрининга. Семь белков клетки-хозяина были идентифицированы в партиях с обогащенными видами HMW mAb1 (партии № 13-15). Количество белков клетки-

хозяина, идентифицированных в партиях с обогащенными видами HMW mAb1, было около в 2-60 раз выше, чем количество белков клетки-хозяина в партии раствора лекарственного средства (партия № 6). На Фиг. 16 представлена диаграмма с относительным количественным определением белков клетки-хозяина в партиях с обогащенными видами HMW mAb1.

5.3 Белки клетки-хозяина, идентифицированные с использованием обогащения анти-НСР IP с последующим картированием пептидов

Пул биотинилированных анти-НСР-антител использовали для извлечения и обогащения НСР путем удаления терапевтических белков и других компонентов. После обогащения, НСР затем расщепляли ферментом и вводили с помощью НаноЛС-МС для идентификации и количественного определения НСР. Тридцать один белок клетки-хозяина был идентифицирован в партиях с обогащенными видами HMW mAb1 (партии № 13-15). Из тридцати одного белка клетки-хозяина партия раствора лекарственного средства показала присутствие только двух белков клетки-хозяина (Таблица 8).

Таблица 8.

#	Доступа	Название белка	Количество совпадений пептидного спектра для каждой партии mAb1				МВт [кДа]	расч. pI
			6	13	14	15		
1	G3IBH0	Ингибитор металлопротеиназы 1	13	74	74	23	22,39	8,47
2	G3IKC3	Глутатион S-трансфераза Му 6	10	75	69	30	86,50	8,21
3	G3HYN7	Бета-гексозаминидаза	0	70	83	14	60,06	7,36
4	G3ILF3	Глутатион S-трансфераза Му 7	0	22	26	0	25,86	7,37
5	G3GYP9	Пероксиредоксин-1	0	15	15	7	22,22	7,72
6	G3IBB1	Сиалат-О-ацетилэстераза	0	8	16	0	61,38	8,22
7	G3I5L3	Аннексин A1	0	11	6	2	38,84	7,02
8	G3I5Z5	Простагландин редуктаза 1	0	9	8	0	42,59	6,27

9	G3H533	Пептидил-пролил цис-транс-изомераза	0	6	5	0	23,62	9,58
10	G3I6T1	Предполагаемая фосфолипазы В-типа 2	0	0	10	4	65,50	6,28
11	G3INC5	Катепсин L1	0	7	5	0	37,22	7,17
12	G3HY03	D-допахромдекарбоксилаза	0	6	5	0	13,12	7,14
13	G3GTT2	Хемокин с мотивом C-C	0	7	3	0	15,85	9,16
14	G3I3K5	Рецептор, связанный с G-белком, 56	0	7	2	0	77,32	8,82
15	G3GUR1	Подкомпонент комплемента C1r-A	0	3	5	0	80,05	6,06
16	G3IEU2	Белок DJ-1	0	4	3	0	19,92	6,79
17	G3HCL3	Член суперсемейства лиганда фактора некроза опухоли 9	0	3	3	0	33,63	6,24
18	G3I3V6	Дискоидин, белок 2, содержащий домены CUB и LCCL	0	2	3	0	73,60	7,49
19	G3GRS9	N-ацетилгалактозамин-6-сульфатаза	0	3	3	0	53,99	6,93
20	G3I664	Проколлагеновый усилитель C-эндопептидазы 1	0	4	0	0	55,19	8,13
21	G3HDU7	Гистон H4	0	2	0	2	10,82	11,50
22	G3I255	L-лактатдегидрогеназа	0	3	0	0	42,15	8,43
23	G3GZZ0	Аспаратаминотрансфераза	0	3	0	0	46,22	7,21
24	G3H0S7	Бета-2-микроглобулин	0	2	1	0	6,39	5,81

25	G3H8V4	Белок-переносчик фосфолипидов	0	3	0	0	54,34	6,65
26	G3GS02	10-формилтетрагидрофолат- дегидрогеназа	0	0	0	2	96,16	5,90
27	G3HNJ3	Кластерин	0	0	0	0	51,72	5,74
28	G3HGM6	N (4)-(Бета-N- ацетилглюкозаминил)-L- аспарагиназа	0	0	2	0	37,21	7,46
29	G3H8V5	Карбоксипептидаза	0	0	1	0	54,19	6,11
30	G3HCX3	Дезоксирибонуклеаза-2-альфа	0	1	0	0	40,38	7,55
31	G3IZY6	Глутатион S-трансфераза Р	0	1	0	0	24,98	8,12

Приведенные выше результаты показывают более высокое количество и обогащение белков клетки-хозяина в партиях с видами NMW mAb1, чем в партии раствора лекарственного средства mAb1. Это предполагает, что белки клетки-хозяина представляют собой обогащенные виды NMW mAb1.

Пример 6.

Лекарственный продукт, содержащий mAb1, также был протестирован на присутствие видимых частиц и белков клетки-хозяина, в дополнение к тестируемому лекарственному раствору mAb1, партии, содержащей NMW виды mAb1 и партии PPQ mAb1.

6.1 Обнаружение частиц

Два флакона (флакон №1 и флакон №2) с лекарственным продуктом, содержащим mAb1, проверяли вручную на наличие частицы (частиц).

6.2 Изоляция частицы

Для каждого флакона, обнаруженную частицу помещали на индивидуальную (Rap ID) покрытую золотом поликарбонатную мембрану с размером пор 5 мкм и покрытием 40/20 нм, как показано на Фиг. 17.

На мембранах делали иссечения: (а) образец частицы-вырезали круглую область диаметром 3 мм с частицей(ами) и (b) отрицательный контроль-вырезали круглую область диаметром 3 мм без частицы (Фиг. 18). Образец частиц и отрицательный образец растворяли в 8 М мочеvine. Три образца частиц и два отрицательных контроля были выделены из мембран для двух флаконов, как показано в Таблице 9.

Таблица 9.

Источник-Флакон №	Золотой фильтр №	Образцы
Флакон №1	Фильтр № 1	Фильтр №1 Частица №1
		Фильтр №1 Контроль
Флакон №2	Фильтр № 2	Фильтр № 2 Частица № 1
		Фильтр № 2 Частица № 2
		Фильтр №2 Контроль

6.3 Рамановский анализ

Рамановскую спектроскопию проводили на частицах, как показано в Примере 2. Рамановские спектры одной из частиц 1, представленные в таблице 9, подтвердили, что частицы были белкового происхождения (см. Фиг. 19). Зеленая кривая, показанная на Фиг. 19 представляет собой эталонный спектр белка, а красная кривая, показанная на Фиг. 19 представляет собой спектр образца частицы.

6.4 Пептидный анализ

Пептидный анализ проводили на частицах, как показано в Примере 2.

Все образцы частиц и отрицательные образцы анализировали на содержание mAb1. Образцы частиц показали высокое содержание белка mAb1, а отрицательные образцы показали отсутствие белка mAb1 (см. Фиг. 20). Величину пиков оценивали на основе усредненных площадей пиков 2 наиболее распространенных пептидов в mAb1.

Белки, отличные от mAb1, полученные в результате пептидного анализа, представлены в таблице 10. Содержание mAb1 в образцах частиц и отрицательных образцах было нормализовано к 1E6 для относительного количественного определения других белков в м.д. в Таблице 10. НО в таблице 10 означает, что белок не был обнаружен.

Таблица 10.

Идентификатор белка	Содержание НСР относительно DS в каждом образце (м.д.)				
	Флакон №1 (Фильтр №1)		Флакон № 2/Фильтр № 2		
	Частица №1	Контроль	Частица №1	Частица №2	Контроль
mAb1	1E6	1E6	1E6	1E6	1E6
G3IBH0	1229	НО	366	328	НО
G3I4H6/A0A061IB69	115	НО	81	93	НО
G3I5L3/A0A061I6Z5	60	НО	НО	НО	НО
G3H533	339	НО	НО	НО	НО
G3HKB0	90	НО	НО	НО	НО
G3H928	169	НО	НО	НО	НО

G3ILF3	83	НО	НО	НО	НО
G3GTT2	НО ²	НО	62	НО	НО

Присутствие белка в образцах частиц и отрицательных образцах показано в таблице 11.

Таблица 11.

UniProt ID	Образцы частиц			Отрицательный контроль	
	Фильтр № 1 Частица №1	Фильтр №2 Частица №1	Фильтр № 2 Частица №2	Фильтр №1 Контроль	Фильтр №2 Контроль
mAb1	Да	Да	Да	Да	Да
G3IBH0	Да	Да	Да		
G3I4H6/A0A061IB69	Да	Да	Да		
G3I5L3/A0A061I6Z5	Да	Да			
G3H533	Да	Да			
G3HKB0	Да	Да			
G3H928	Да				
G3ILF3	Да				
G3GTT2		Да			

Пептидный анализ выявил присутствие белков клетки-хозяина в частице, выделенной из лекарственного продукта, содержащего mAb1.

Пример 7.

Обнаружение невидимых частиц также выполняли с использованием составленного лекарственного средства (FDS), содержащего mAb1.

Для выделения невидимых частиц 1,5 мл раствора FDS наносили пипеткой на покрытую золотом поликарбонатную мембрану с размером пор 5 мкМ и покрытием 40/20 нм. Затем ее промывали водой milli-Q. Отрицательный контроль без частиц был установлен для сравнения путем первоначального внесения пипеткой 1,5 мл раствора FDS на фильтр 0,2 мкМ (Millipore) и сбора проточного раствора. Затем проточный раствор наносили пипеткой на покрытую золотом поликарбонатную мембрану с размером пор 5

мкМ и покрытием 40/20 нм и промывали водой milli-Q.

Рамановский анализ и пептидный анализ выполняли, как описано в Примере 2. Частицы, содержащие белок, идентифицировали с помощью рамановской спектроскопии. Темные изображения частиц, содержащих белки, идентифицированные указанным способом, показаны на Фиг. 21. Пептидный анализ невидимых частиц продемонстрировал присутствие белка клетки-хозяина ингибитора металлопротеиназы 1 вместе с mAb1, тогда как отрицательный контроль без частиц показал присутствие только mAb1. Отсутствие белка клетки-хозяина ингибитора металлопротеиназы 1 в отрицательном контроле без частиц предполагает, что белками клетки-хозяина были обогащены только невидимые частицы (Таблица 12).

Идентификатор белка	Описание	Обнаружено с помощью наноЖХ-МС/МС	
		Невидимые частицы	Отрицательный контроль без частиц
mAb1	Тяжелая цепь	Да	Да
mAb1	Легкая цепь	Да	Да
TIMP1	Ингибитор металлопротеиназы 1 UniProt ID: P01033	Да	Нет

Пример 8.

Чтобы оценить присутствие белков клетки-хозяина в биопроцессе, была протестирована жидкость для культивирования клеток (HCCF) из доклинического производства и разработки процессов (PMPD) mAb2. HCCF для mAb2 показала присутствие частиц после стерильного фильтрования и цикла замораживания-оттаивания. Во время стадии стерилизующего фильтрования HCCF в Промышленных операциях и поставках продукции (IOPS) наблюдалось высокое противодавление, что указывало на то, что некоторые нерастворимые материалы засоряли фильтр.

Выделение частиц, рамановский анализ и пептидный анализ выполняли, как описано в Примере 2. На Фиг. 22 показано темное заполненное изображение и рамановское изображение частиц. Помимо mAb2, в одной из частиц было идентифицировано 743 белка клетки-хозяина. В первую десятку HCP (на основе охвата последовательностей) вошли L-лактатдегидрогеназа (доступ UniProt: Q06BU8), цитоплазматический актин (доступ UniProt: G3GVD0), транскетолаза (доступ в UniProt: G3GUU5), бета-ингибитор диссоциации ГДФ Rab (доступ в UniProt: G3GR73), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (доступ UniProt: P17244), каталитическая субъединица А протонной АТФазы V-типа (доступ в UniProt: G3H066), трансгелин

(доступ в UniProt: G3H7Z2), глутатион-S-трансфераза Mu 5 (доступ UniProt: G3ILF1), хлоридный белок внутриклеточного канала 4 (доступ UniProt: G3HNU4) и лейкотриен A-4 гидролаза (доступ UniProt: G3HBI9).

Пример 9.

Частицы, состоящие из белков клетки-хозяина на разных стадиях биопроцесса, могут приводить к снижению фильтрующей способности. Чтобы оценить присутствие белков клетки-хозяина в биопроцессе, тестировали жидкость культивирования для клеток (CCF) для биопроцесса mAb3/mAb2.

9.1 Оценка пропускной способности фильтра

Процессы RMPD и IOPS показали аномально низкую пропускную способность фильтрования CCF в нескольких партиях из различных программ. Для одной партии mAb3/mAb2 емкость фильтра собираемого пула оценивали после инкубирования в течение 0, 24, 48 и 72 часов при комнатной температуре. Оценку пропускной способности фильтра проводили с использованием способа V_{max} на пуле фильтров CCF в вышеупомянутые моменты времени (протокол испытания постоянного давления V_{max}^{TM} , Merck Millipore). В тесте V_{max}^{TM} время и объем, собранные до этого времени, регистрировались через равные промежутки времени. Затем данные были нанесены на график как время/объем в зависимости от времени.

Два типа фильтров были использованы для оценки- Sartopore[®] 2 (два слоя фильтров с размером пор 0,45 мкм и 0,2 мкм, соответственно) и LifeASSURETM (два слоя фильтров с 0,65 мкм и 0,2 мкм, соответственно)). График зависимости емкости V_{max} (л/м²) от времени в часах (см. Фиг. 23) показал снижение V_{max}^{TM} с течением времени, что указывает на агрегацию или образование частиц с течением времени. Увеличение времени также показало увеличение мутности. Это увеличение мутности и снижение фильтрующей способности может быть связано с осаждением белков клетки-хозяина или раствора лекарственного средства с течением времени, засоряющим фильтры.

9.2 Количественное определение содержания белка

Чтобы выяснить причину увеличения мутности и снижения фильтрующей способности, CCF для mAb2 (pI: ~ 6,3) инкубировали перед фильтрованием в течение 0, 24, 48 и 72 часов при pH 5,60-6,10. Инкубированную жидкость CCF в каждый момент времени фильтровали с использованием фильтра LifeASSURETM (два слоя фильтров с 0,65 мкм и 0,2 мкм соответственно).

Чтобы оценить, какие белки выпали в осадок с течением времени, фильтры разрезали и анализировали диски диаметром 4 мм (см. Фиг. 24). Вырезанный фильтр погружали в 8М мочевины и 10 мМ ТСЕР-HCl и инкубировали при 50°C в течение 30 минут для растворения, денатурирования и восстановления белка на разрезанном фильтре. Затем образцы инкубировали с 10 мМ индол-3-уксусной кислотой (IAA) при комнатной температуре в течение 30 минут. Образцы инкубата обрабатывали 1 мкг rLysC в течение 1 часа в денатурирующих условиях с последующим разбавлением Трис-HCl. К этой смеси добавляли 1 мкг трипсина и продолжали расщепление в течение 3 часов. Затем

расщепленную смесь подкисляли 20% муравьиной кислотой (МК) с последующим анализом нано-ЖХ-МС/МС. Определение присутствия белка было основано на среднем содержании сигнала масс-спектрометрии трех верхних ионов пептида, которые приписывались конкретному белку.

Всего в CCF mAb2 было идентифицировано 2366 поддающихся количественной оценке белков. Из идентифицированных белков 1880 белков были включены для дальнейшего анализа (486 белков были исключены, поскольку они показали менее двух уникальных пептидов на белок). Самым распространенным белком было mAb2. Содержание mAb2 на фильтре не изменялось со временем (см. Фиг. 25 и Таблица 13).

Таблица 13.

Белок	Отношение T0/T0	Соотношение T24/T0	Соотношение T48/T0	Соотношение T72/T0
mAb2 LC	1,00	1,02	1,28	1,42
mAb2 HC	1,00	0,93	0,91	0,79

Среднее количество LC mAb2 было установлено равным 1Еб, а количество других белков рассчитано с использованием площадей пиков НСР в пептидном масс-спектрометре и было нормализовано относительно среднего количества LC mAb2. Пятьдесят самых распространенных белков (перечисленных в Таблице 14) были тщательно изучены, поскольку они с большей вероятностью засоряют фильтры.

Таблица 14.

№	Доступа	Описание	ММРас (Кд ч. а) рI	Относительное количество относительно mAb2 LC (м.ч.)				Соотношение		
				T0	T24	T48	T72	T24/ T0	T48/ T0	T72/ T0
1	mAb2 LC	mAb2 LC	23,5 8,29	849424,3	864288,0	1083370,2	1202917,5	1,0	1,3	1,4
2	mAb2 HC	mAb2 HC	48,9 6,37	506563,6	469802,7	460417,7	398929,1	0,9	0,9	0,8
3	G3I1V3	Фибронектин	273,3 5,44	27041,7	30534,9	64162,5	125338,2	1,1	2,4	4,6
4	Q9ERP7	Катепсин Z	34,0 6,68	5524,6	5194,9	57941,1	104908,8	0,9	10,5	19,0
5	G3HNJ3	Кластерин	51,7 5,51	34533,8	36067,1	50770,9	56806,0	1,0	1,5	1,6

6	G3IBF4	Сериновая протеаза HTRA1	28,7	6,54	12754,5	11588,1	37433,8	56748,6	0,9	2,9	4,4
7	G3GVD0	Цитоплазматический актин 1	41,7	5,29	12927,6	16207,9	36190,2	47771,6	1,3	2,8	3,7
8	Q9WV24	Бета-2-микроглобулин	13,8	7,08	5227,7	5978,0	18710,8	44490,9	1,1	3,6	8,5
9	G3IBH0	Ингибитор металлопротеиназы 1	22,4	8,74	1637,8	1482,0	14522,5	36234,4	0,9	8,9	22,1
10	P17244	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	35,7	8,49	14332,1	17828,0	25183,3	29354,1	1,2	1,8	2,0
11	G3H1W4	Тубулоинтерстициальный нефрит антигеноподобный	52,5	6,73	16774,3	13111,5	19175,0	23409,9	0,8	1,1	1,4
12	A0A061KA1	Липопротеин липаза	54,6	7,94	12714,5	12436,6	17956,6	20776,0	1,0	1,4	1,6
13	G3HQQY6	Липаза	45,6	7,43	11294,8	10967,2	16138,6	19445,8	1,0	1,4	1,7
14	P62629	Коэффициент удлинения альфа 1	1-50,1	9,10	13770,0	14259,3	16568,8	19366,2	1,0	1,2	1,4
15	G3I8R9	Глюкозо-регулируемый белок 78 кДа	72,3	5,01	10128,8	25865,6	41706,4	17820,4	2,6	4,1	1,8
16	G3GUR1	Подкомпонент комплемента C1r-A	80,0	5,64	5376,2	5637,8	11704,9	17444,1	1,0	2,2	3,2
17	G3HNF5	Папилин (фрагмент)	127,2	7,27	463,9	490,3	4580,1	16039,8	1,1	9,9	34,6
18	G3GXZ0	Белок-глутамин гамма-	77,2	5,11	4526,0	6593,4	12121,1	14431,9	1,5	2,7	3,2

		глутамилтрансфе- -раза 2									
19	G3I1Y9	Сульфатный гликопротеин 1	27,4	5,35	4288,9	3455,4	6153,1	11892,6	0,8	1,4	2,8
20	A0A061I5 23	Проколлагеновы й усилитель C- эндопептидазы 1	50,4	7,94	5237,6	5455,5	9859,9	11552,8	1,0	1,9	2,2
21	G3HLK3	Гранулины	63,9	5,97	1541,7	1771,4	7858,8	10614,2	1,1	5,1	6,9
22	G3HC84	Белок теплового шока HSP 90- бета	47,8	5,32	3915,9	4483,9	9716,8	9920,4	1,1	2,5	2,5
23	G3GUR0	Кальций- зависимая сериновая протеиназа	77,4	4,72	2204,4	2153,9	5351,9	9894,8	1,0	2,4	4,5
24	G3HHV4	Тромбоспондин- 1	60,0	4,25	4163,8	4863,3	7442,9	9109,5	1,2	1,8	2,2
25	G3H1D5	Карбоксипептида за	51,2	5,30	4184,9	3967,5	6985,5	8678,0	0,9	1,7	2,1
26	G3IAQ0	Альфа-енолаза	46,7	5,85	4290,5	4413,4	6823,4	8376,7	1,0	1,6	2,0
27	G3I4W7	Катепсин D	44,1	6,59	3412,6	2873,9	4601,9	7320,9	0,8	1,3	2,1
28	G3HDL6	Фактор удлинения 1-бета	24,7	4,50	2857,1	7716,5	9131,7	7289,8	2,7	3,2	2,6
29	G3H8V4	Белок- переносчик фосфолипидов	54,3	6,24	4397,5	3564,0	5887,0	7227,7	0,8	1,3	1,6
30	G3HEI6	Лизилоксидазо- подобный 1	62,1	6,14	702,8	824,5	2371,9	6174,7	1,2	3,4	8,8
31	G3H3E2	Белок 1, связанный с фактором некроза опухоли, комплемент C1q	35,6	7,77	95,2	1153,6	5031,2	6131,5	12,1	52,9	64,4
32	A0A061I5	Родственный	70,6	5,37	2472,1	4204,9	7601,5	5286,1	1,7	3,1	2,1

	D1	белку теплового шока									
33	A0A061IEA0	Фактор удлинения 1-дельта-подобная изоформа 1	72,9	6,66	1918,6	4159,7	5562,9	5180,7	2,2	2,9	2,7
34	G3HIQ1	Пептидил-пролил цис-транс-изомераза	17,9	8,44	9127,8	7989,4	7293,1	4981,2	0,9	0,8	0,5
35	A0A061IC58	Коэффициент удлинения 1-гамма	51,7	6,38	2770,1	4803,2	5660,0	4649,3	1,7	2,0	1,7
36	G3GTT2	Хемокин с мотивом C-C	15,8	9,39	1933,9	1795,2	3154,8	4609,6	0,9	1,6	2,4
37	G3HRK9	Матричная металлопротеина за-19	58,9	7,81	2621,2	2496,7	3902,4	4481,2	1,0	1,5	1,7
38	G3H3E4	Галектин-3-связывающий белок	63,8	5,05	4876,8	5402,7	3752,6	4400,0	1,1	0,8	0,9
39	A0A098KXC0	Пируваткиназа	81,4	8,59	2771,2	2823,6	3984,9	4374,1	1,0	1,4	1,6
40	G3HTE5	Лизосомальная альфа-глюкозидаза	105,8	5,65	2163,0	2207,5	3525,0	4352,6	1,0	1,6	2,0
41	Q9JKY1	Пероксиредоксин-1	22,2	8,21	3376,6	3373,7	4327,3	4331,9	1,0	1,3	1,3
42	G3H8F4	Дистрогликан	96,8	8,70	1733,3	1889,3	2976,1	4324,7	1,1	1,7	2,5
43	A0A061I2S4	Предполагаемый на первый взгляд белок, подобный белку (фрагмент)	23,5	5,42	1138,2	1224,6	2957,2	4316,1	1,1	2,6	3,8
44	G3HBI1	Пероксидазин-подобный	165,3	6,49	1003,0	845,2	2640,4	4245,4	0,8	2,6	4,2

45	G3H0L9	Катепсин В	37,5	5,73	2070,2	1615,1	2211,7	3850,9	0,8	1,1	1,9
46	G3IEB7	Схожий на белок	17,7	8,38	927,5	1002,5	2925,0	3843,2	1,1	3,2	4,1
47	G3HP49	Тетранектин	22,3	5,58	692,3	673,0	1734,3	3754,3	1,0	2,5	5,4
48	G3IDM2	Кофилин-1	18,5	8,22	2133,0	2177,6	2914,8	3634,8	1,0	1,4	1,7
49	G3HWE4	Нидоген-1	79,0	4,77	1316,4	1191,5	2274,9	3627,7	0,9	1,7	2,8
50	G3H3E6	Ингибитор металлопротеина зы 2	21,5	7,47	205,8	229,8	1196,4	3609,7	1,1	5,8	17,5

Параллельный график относительной численности mAb2 в зависимости от времени показал, что некоторые из высокораспространенных НСР увеличивались с течением времени (см. Фиг. 26).

Чтобы понять количество НСР, осажденных в инкубированном ССФ фильтре в разные моменты времени, был построен пузырьковый график отношения содержания НСР в момент времени Т/содержание НСР в момент Т0 по сравнению с относительным количеством mAb2 LC в момент времени Т (м.ч.), как показано на Фиг. 27 (Т=0 часов), Фиг. 28 (Т=24 часа), Фиг. 29 (Т=48 часов), и Фиг. 30 (Т=72 часа). Как показано на Фиг. 28, некоторые из НСР (например, Комплемента C1q некроза опухоли, фактор элонгации 1-бета, 78 кДа глюкозо-регулируемый белок и дельта-подобная изоформа 1 фактора элонгации 1) увеличились более чем в 2 раза, что коррелировало с умеренным снижением емкости фильтра. Через 48 часов количество НСР увеличилось более чем в 2 раза, что коррелирует с аналогичным значительным уменьшением пропускной способности фильтра (см. Фиг. 29). Через 72 часа, количество через 72 часа почти для всех пятидесяти топ НСР увеличилось более чем в 2 раза по сравнению с их количеством в момент времени 0 час (см. Фиг. 30). Для девяти белков из пятидесяти топ НСР количество увеличилось более чем в 5 раз по сравнению с их содержанием в момент времени 0 час (Таблица 14).

Среди пятидесяти топ НСР уровень фибронектина увеличился в 4,6 раза через 72 часа, имел самую высокую молекулярную массу и, возможно, был наиболее вероятной причиной снижения фильтрующей способности.

Невидимые или видимые частицы могут привести к уменьшению фильтрующей способности, и обнаружение основной причины образования невидимых или видимых частиц, или основной причины уменьшения фильтрующей способности может быть обязательным для лекарственных препаратов или биопроцессов. После выявления причины можно предпринять шаги, чтобы ее избежать. Описанные в данном документе способы могут способствовать выявлению первопричины образования видимых и невидимых частиц.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ характеристики белка по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце, включающий:

обнаружение по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце;
выделение и захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для идентификации присутствия белка; и

применение масс-спектрометра для характеристики белка.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что присутствие по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы определяется с помощью рамановской спектроскопии.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна видимая или невидимая частица имеет размер по меньшей мере около 100 мкм.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что по меньшей мере одна видимая или невидимая частица является изначальной примесью.

5. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию захвата по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы на поликарбонатную мембрану с золотым покрытием.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что размер пор поликарбонатной мембраны с золотым покрытием составляет около 5 мкм.

7. Способ по п. 1, дополнительно включающий растворение образца в мочеvine после выполнения анализа с помощью рамановской спектроскопии.

8. Способ по п. 6, отличающийся тем, что концентрация мочеvine составляет около 8 М.

9. Способ по п. 1, дополнительно включающий стадию расщепления образца в денатурирующих условиях после проведения анализа с помощью рамановской спектроскопии.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что образец дополнительно содержит представляющий интерес белок.

11. Способ по п. 9, отличающийся тем, что представляющий интерес белок представляет собой антитело.

12. Способ по п. 9, отличающийся тем, что представляющий интерес белок представляет собой терапевтическое антитело.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

14. Способ по п. 12, отличающийся тем, что система жидкостной хроматографии представляет собой систему наножидкостной хроматографии.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой tandemный масс-спектрометр.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что белок представляет собой белок клетки-хозяина.

17. Способ количественного определения по меньшей мере одного белка по

меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце, включающий:

обнаружение по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце;
выделение и захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для идентификации присутствия по меньшей мере одного белка; и
идентификацию по меньшей мере одного белка с помощью масс-спектрометра.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что по меньшей мере один белок является белком клетки-хозяина.

19. Способ по п. 17, отличающийся тем, что по меньшей мере одна видимая или невидимая частица представляет собой агрегат белка.

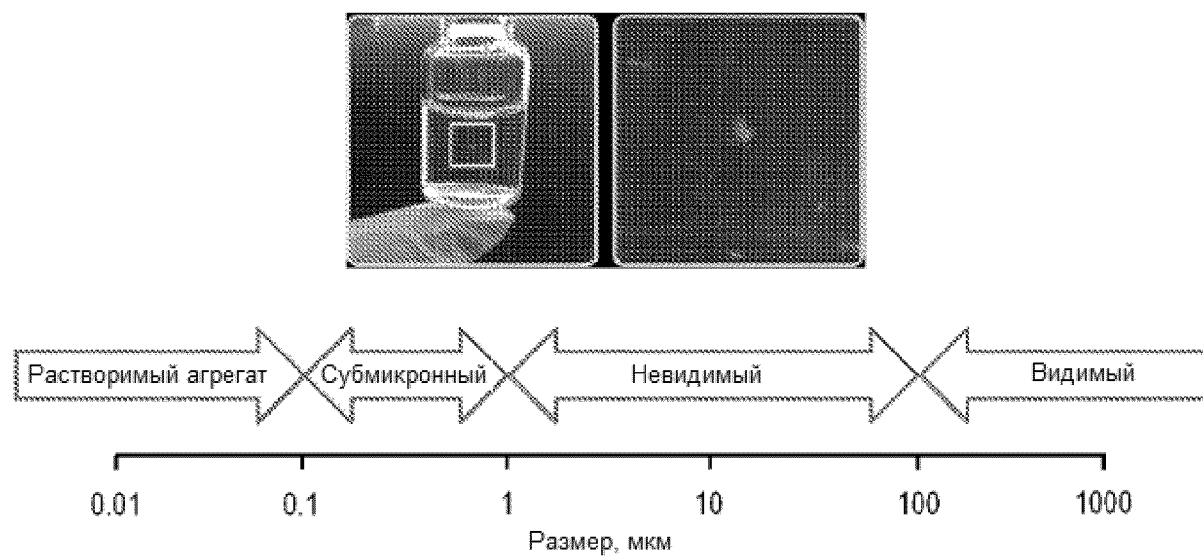
20. Способ характеристики белка клетки-хозяина по меньшей мере в одной видимой или невидимой частице в образце, включающий:

обнаружение по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы в образце;
выделение и захват по меньшей мере одной видимой или невидимой частицы для идентификации присутствия белка; и

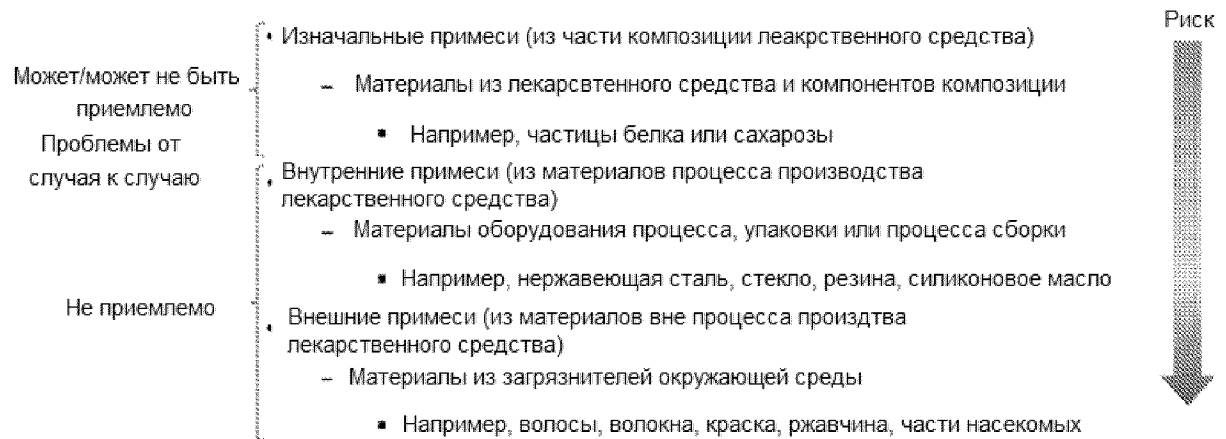
применение масс-спектрометра для характеристики белка с целью определить, является ли белок белком клетки-хозяина.

По доверенности

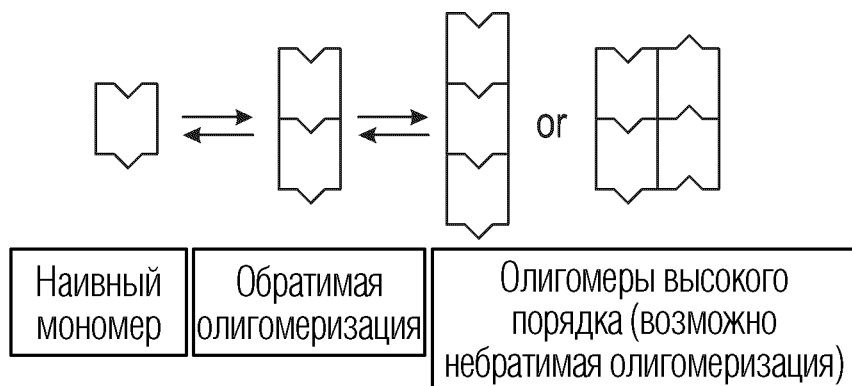
Фиг. 1



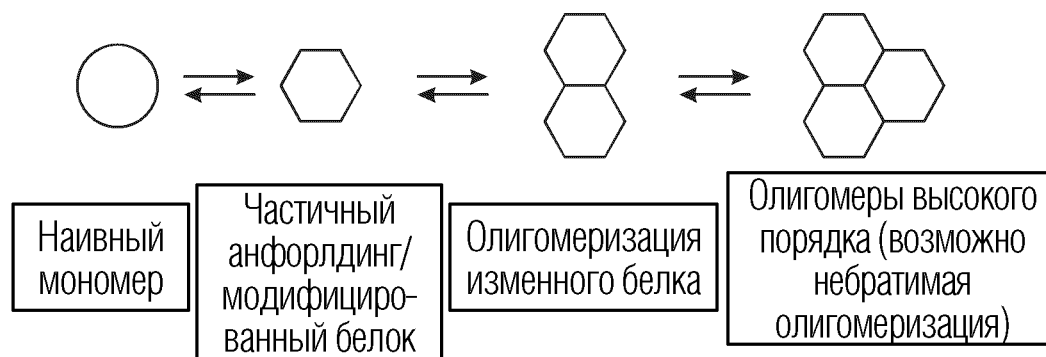
Фиг. 2



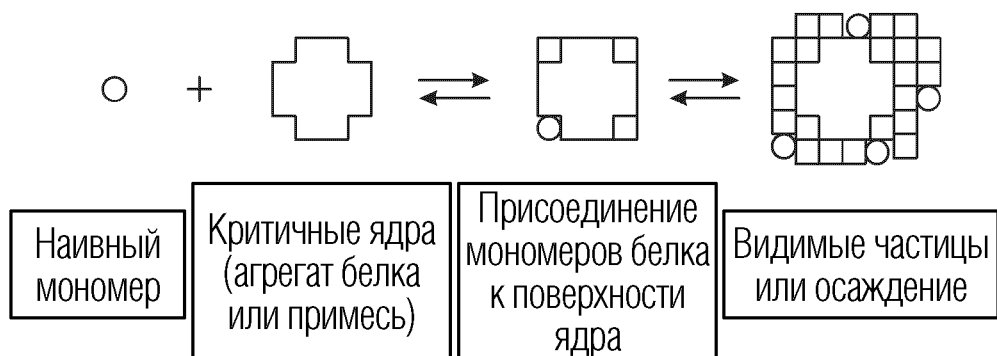
Механизм 1: Аккумуляирование нативного белка



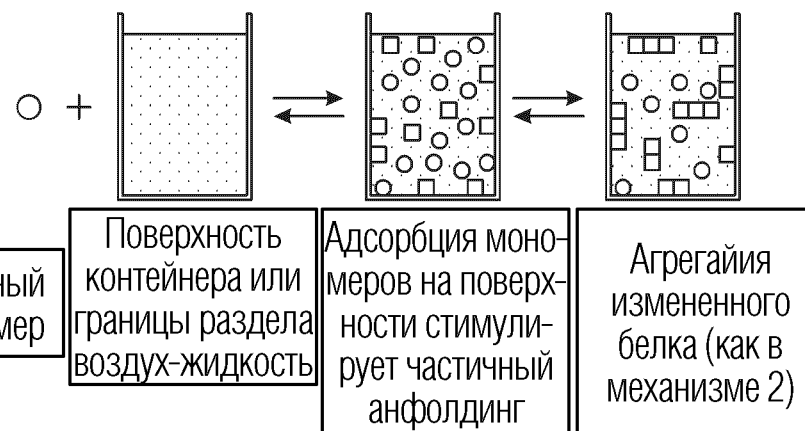
Механизм 2: Аккумуляирование измененного белка



Механизм 3: Индуцированная ядром агрегация



Механизм 4: Индуцированная поверхностью агрегация



ФИГ. 3

Фиг. 4



Фиг. 5



Источник : www.fda.gov/Safety/Recalls/default.htm

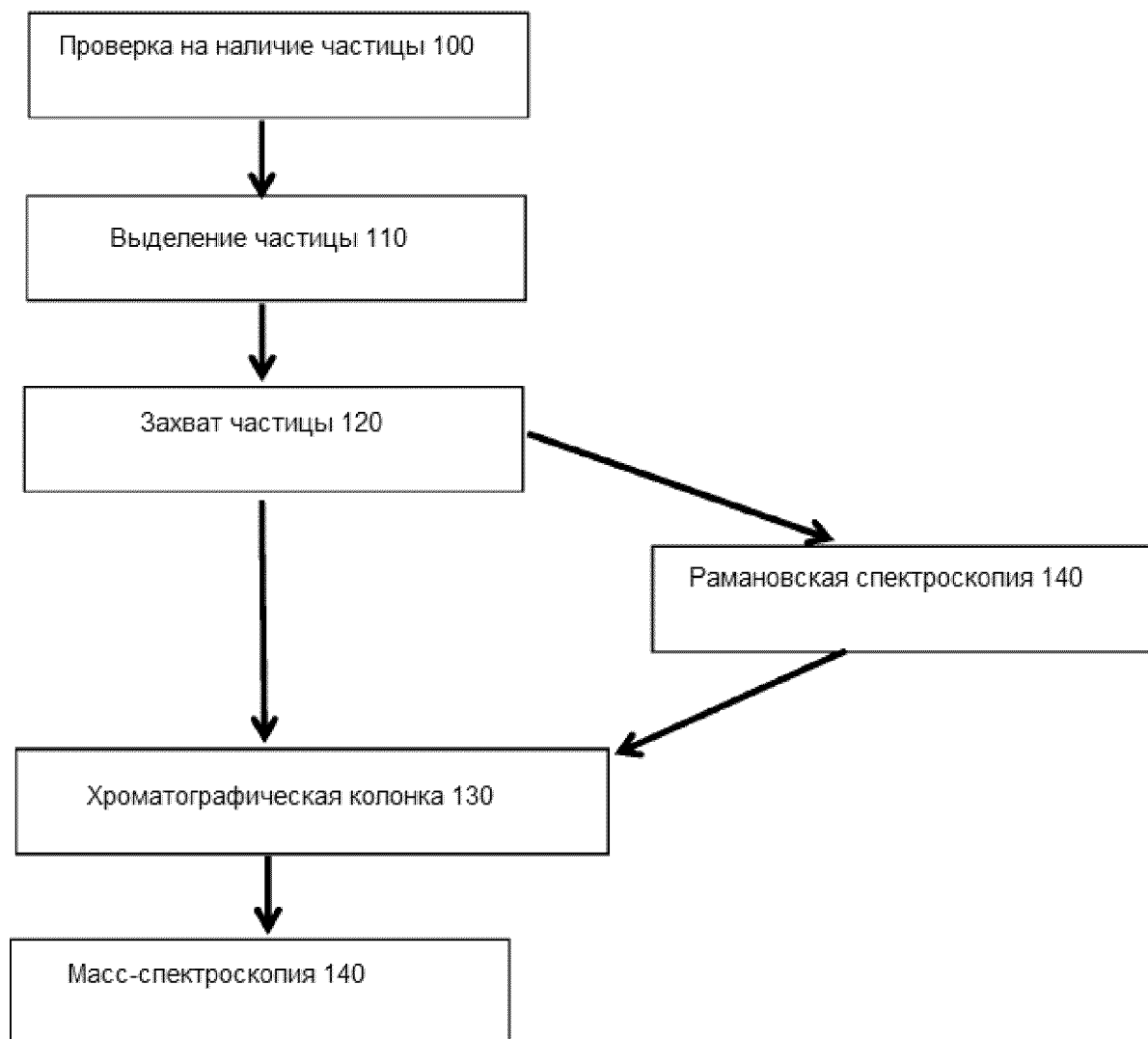
Фиг. 6

отзывы FDA стерильных инъекционных лекарственных средств 2008-2021

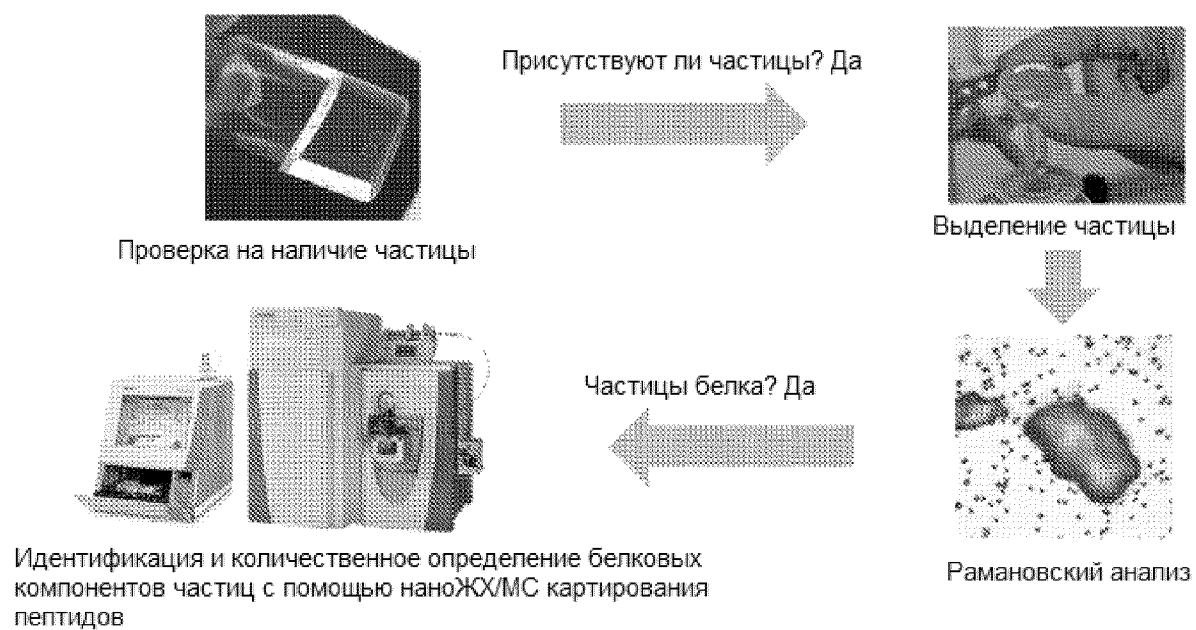


Источник : Отдел FDA по контролю за производством и контролем качества, 14 Марта, 2013

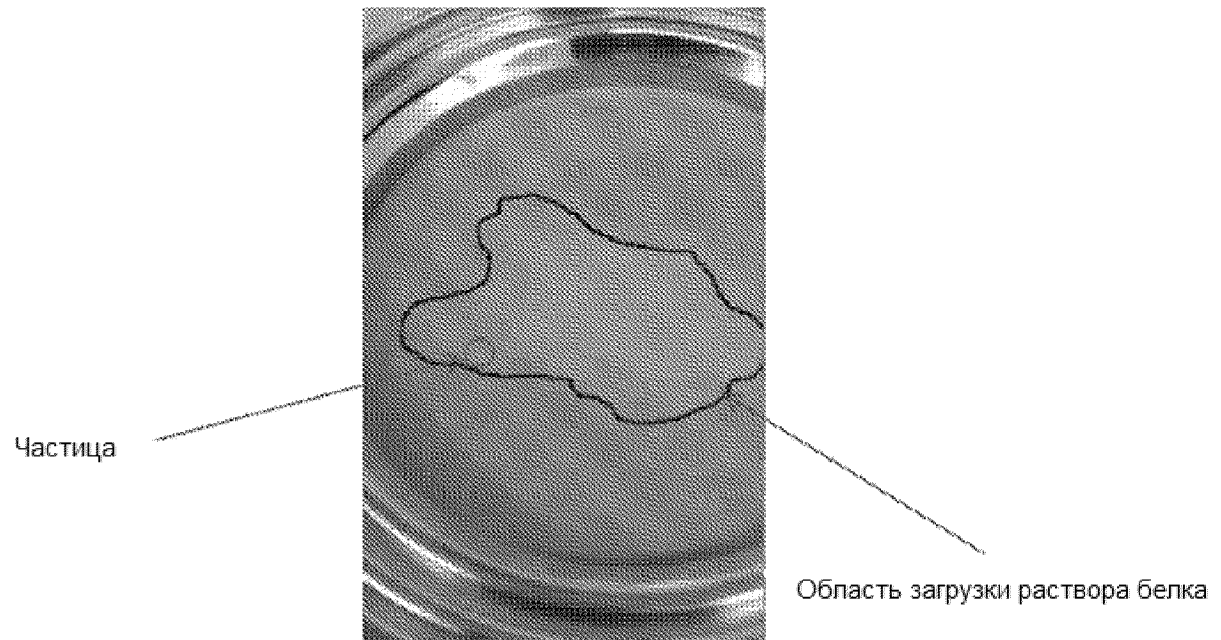
Фиг. 7



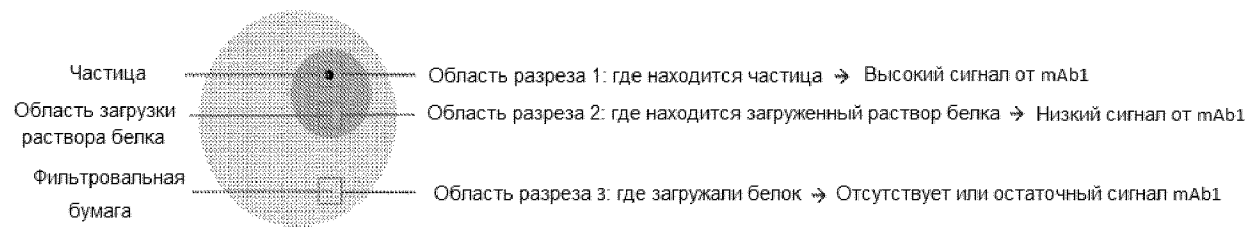
Фиг. 8

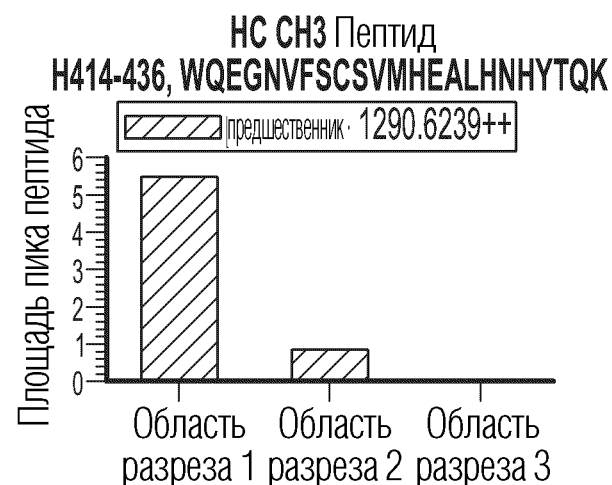
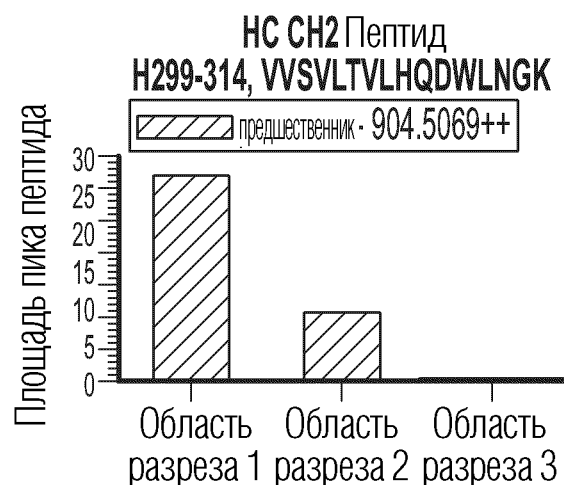
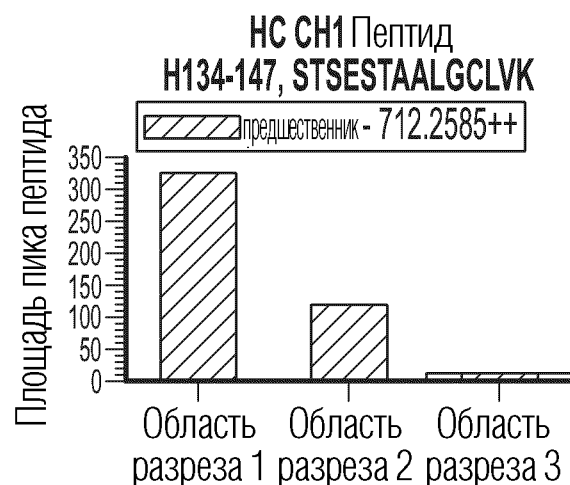
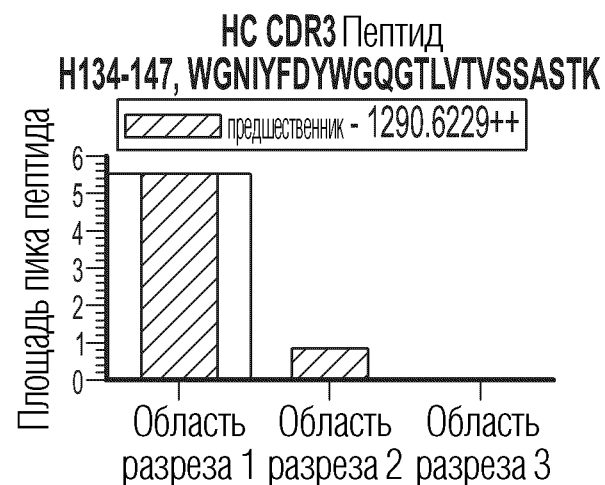
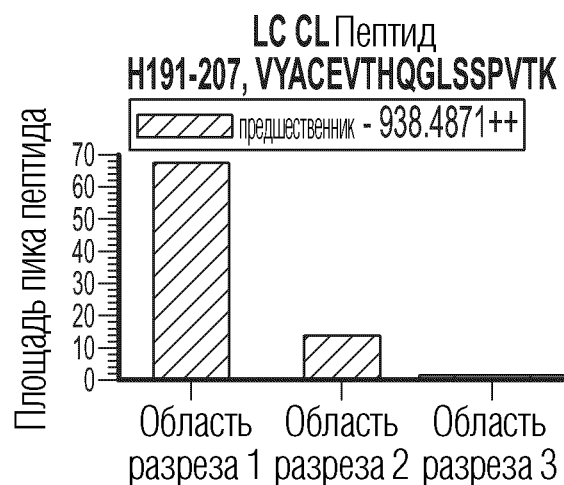
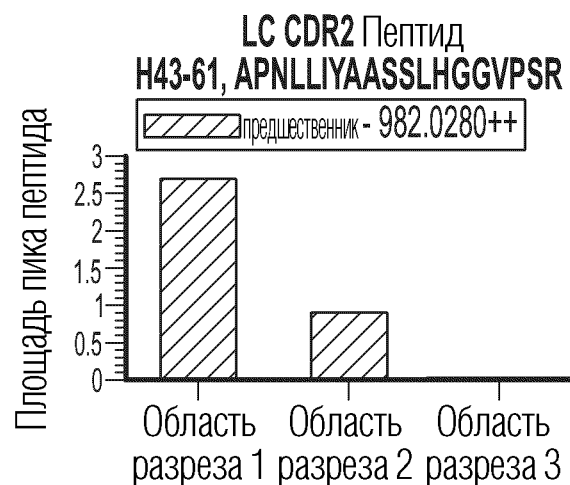


Фиг. 9



Фиг. 10





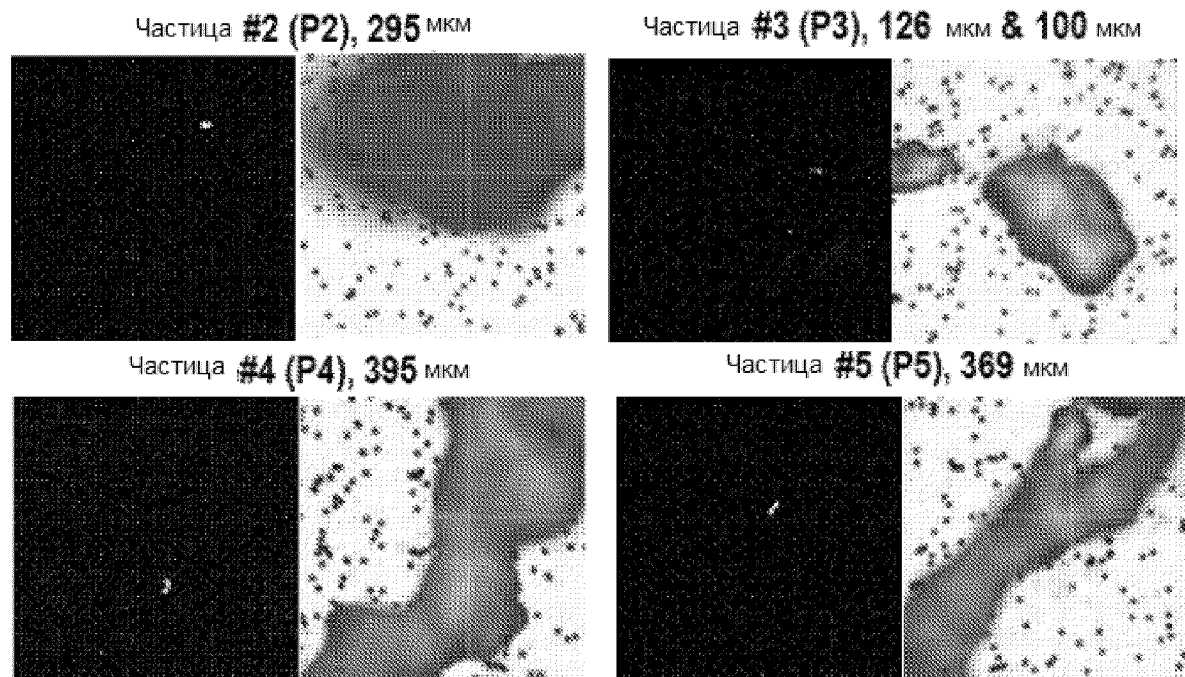
ФИГ. 11

Фиг. 12

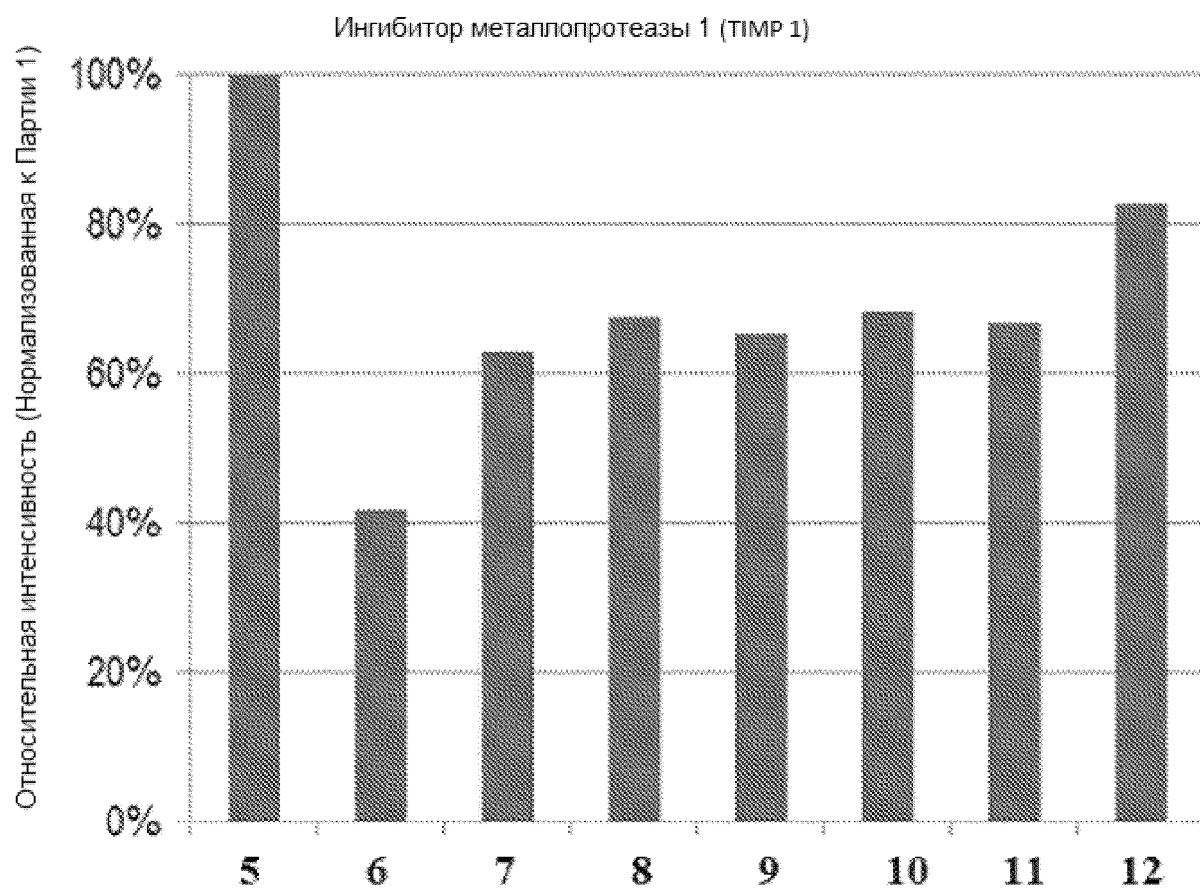


Поликарбонатная мембрана покрытая
золотом с размером пор 5 мкм

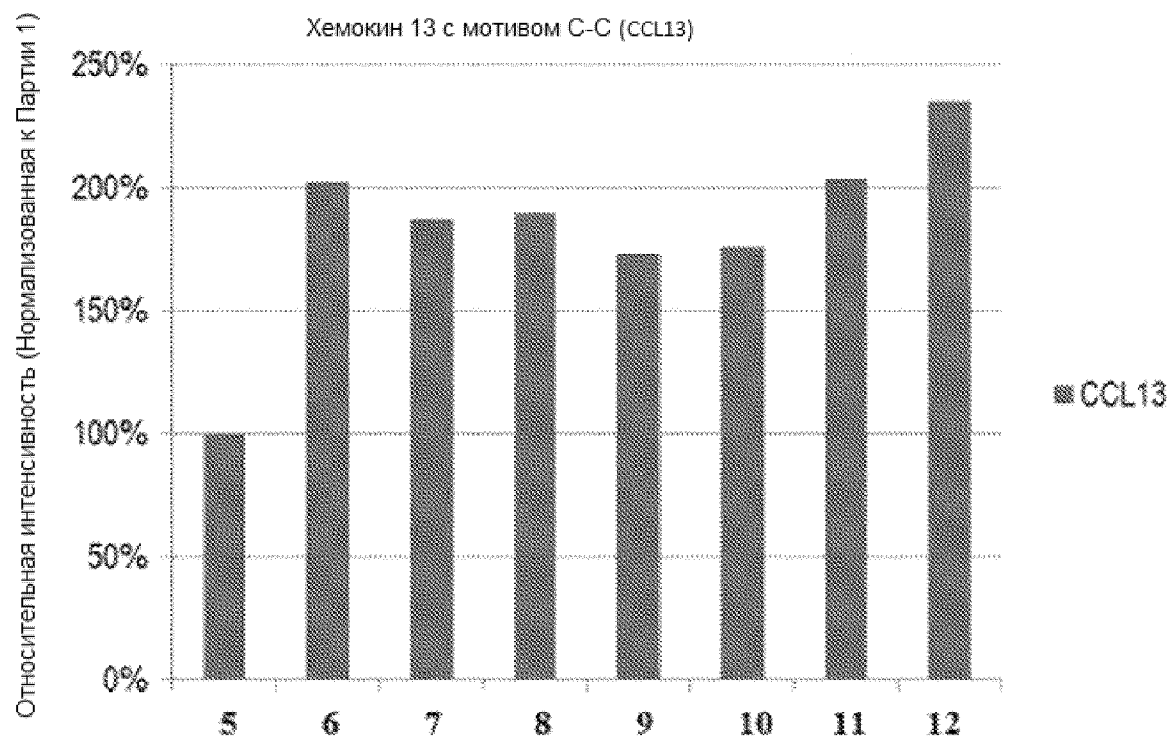
Фиг. 13

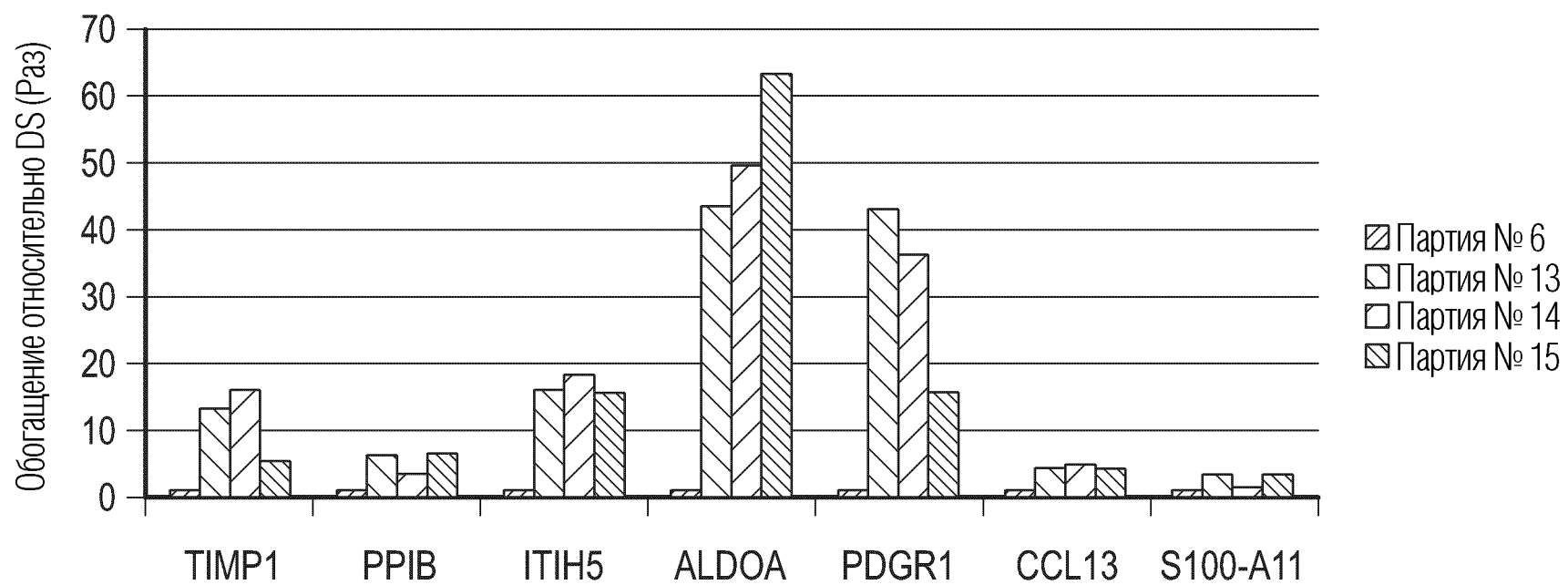


Фиг. 14



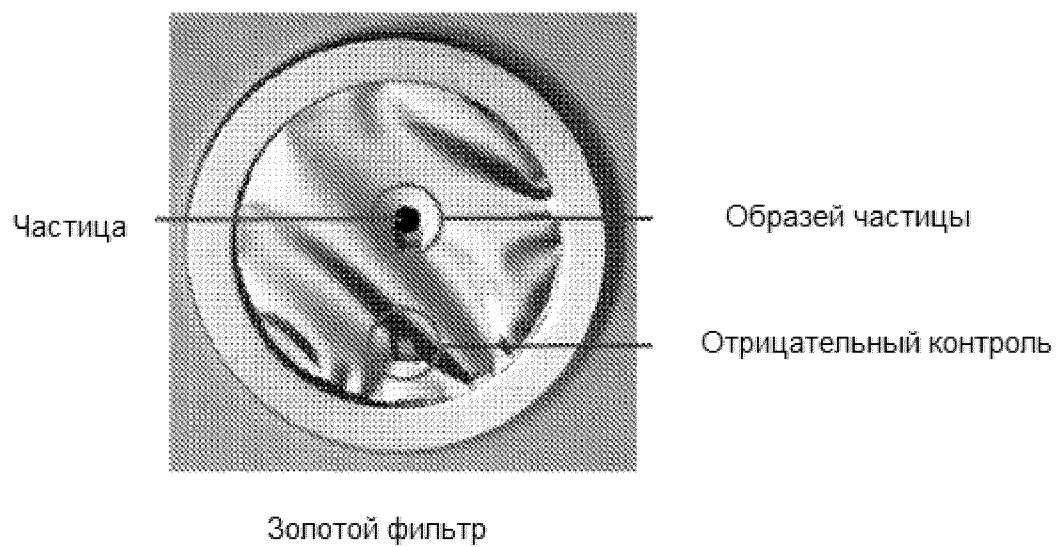
Фиг. 15



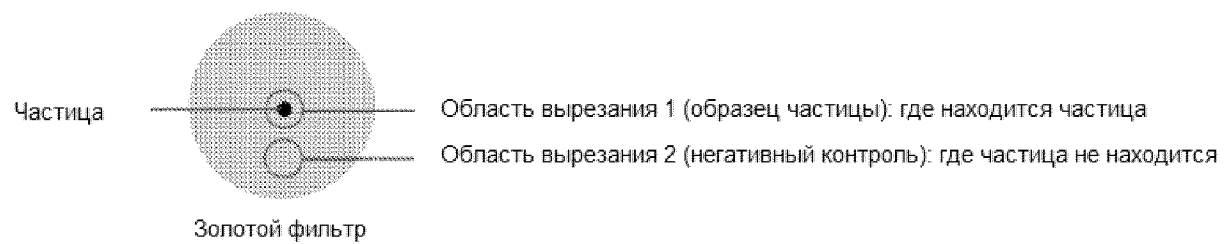


ФИГ. 16

Фиг. 17



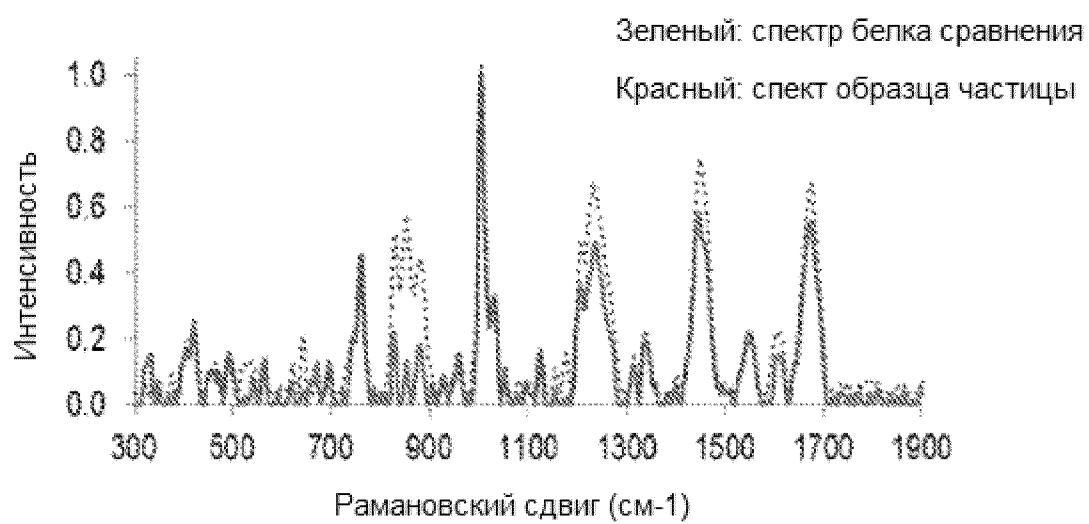
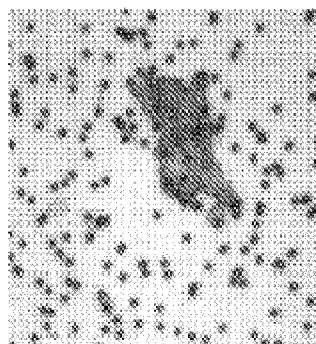
Фиг. 18



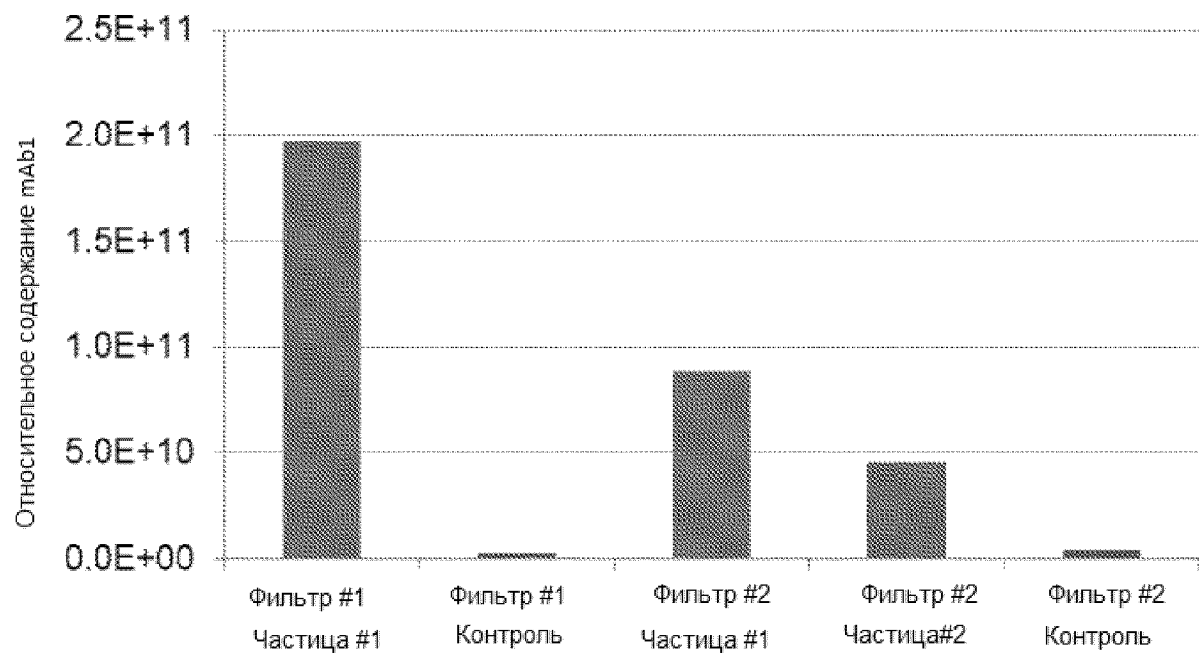
Фиг. 19

Частица белка (~111,7 мкм)

Рамановское изображение

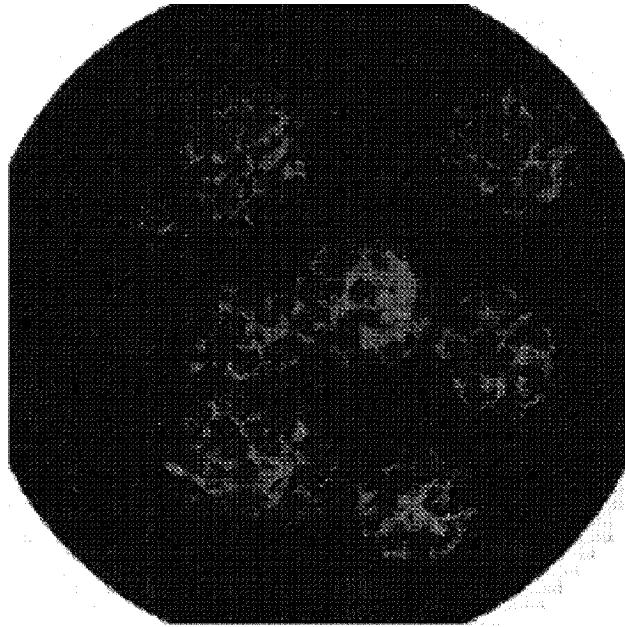


Фиг. 20

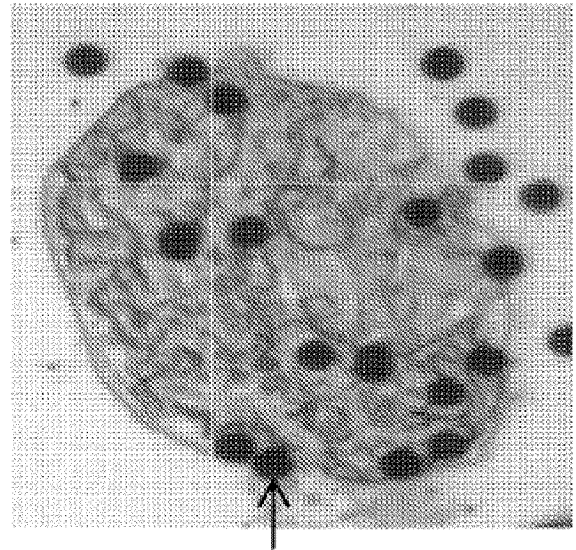


Фиг. 22

Темное заполненное изображение



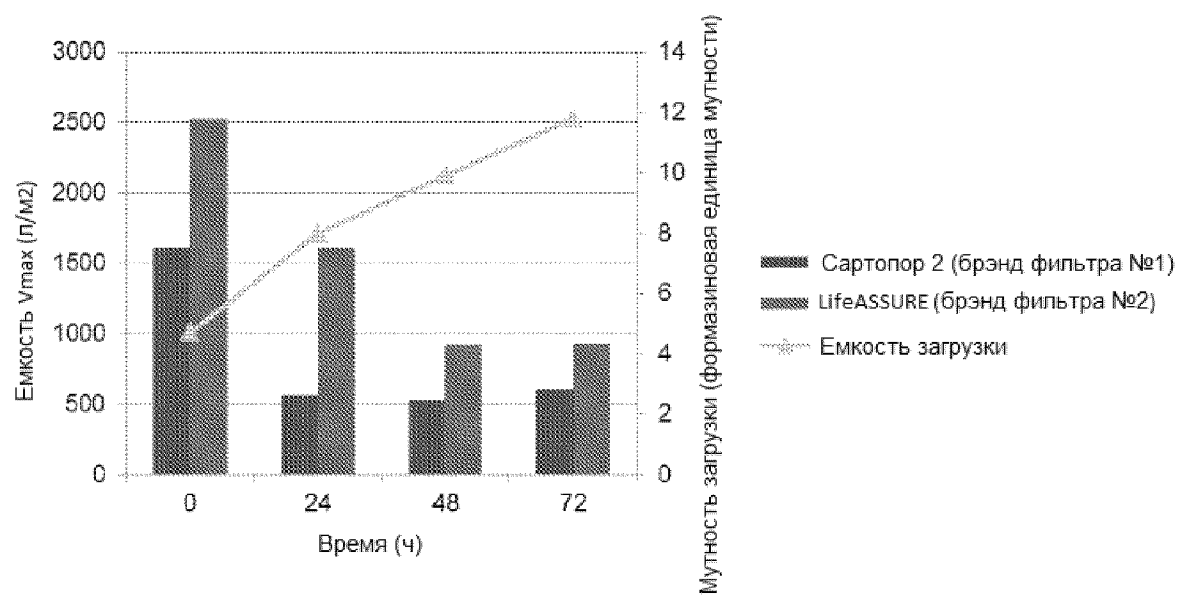
Рамановское изображение



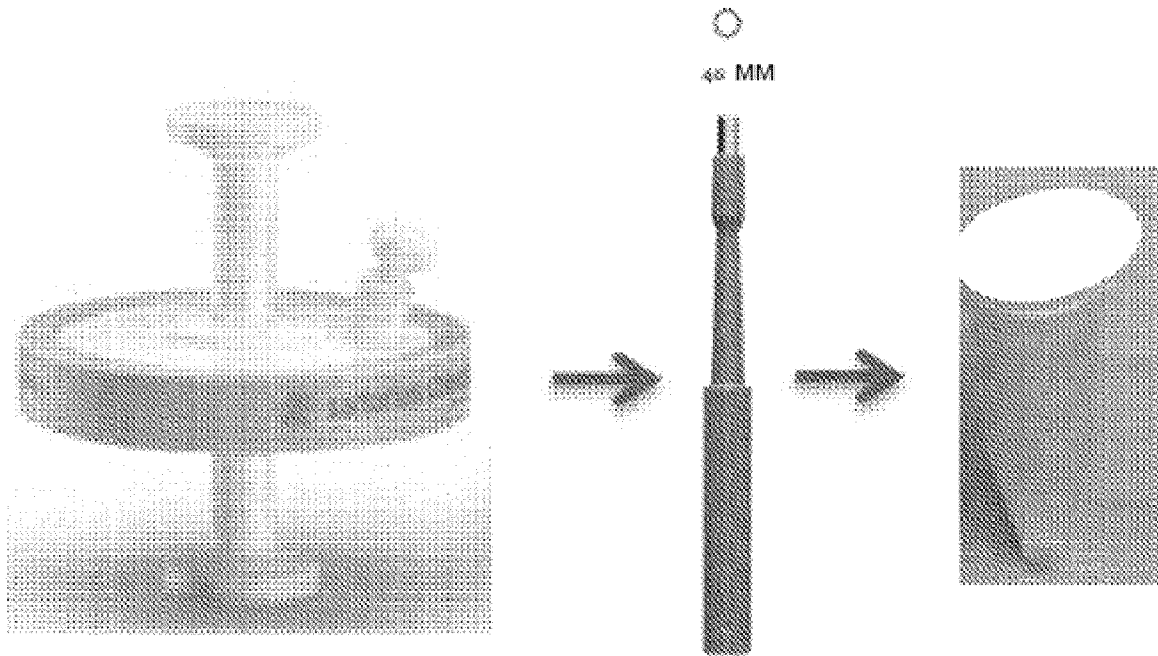
5 мкм поры фильтра

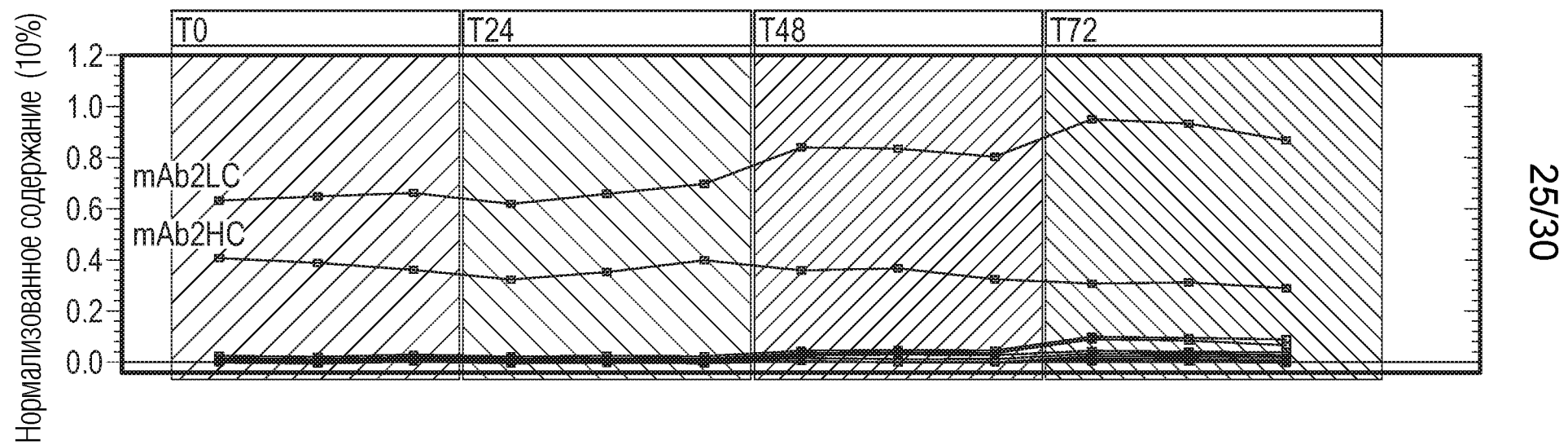
Размеры пятен частиц >2 мм; Рамановская идентификация = Белок

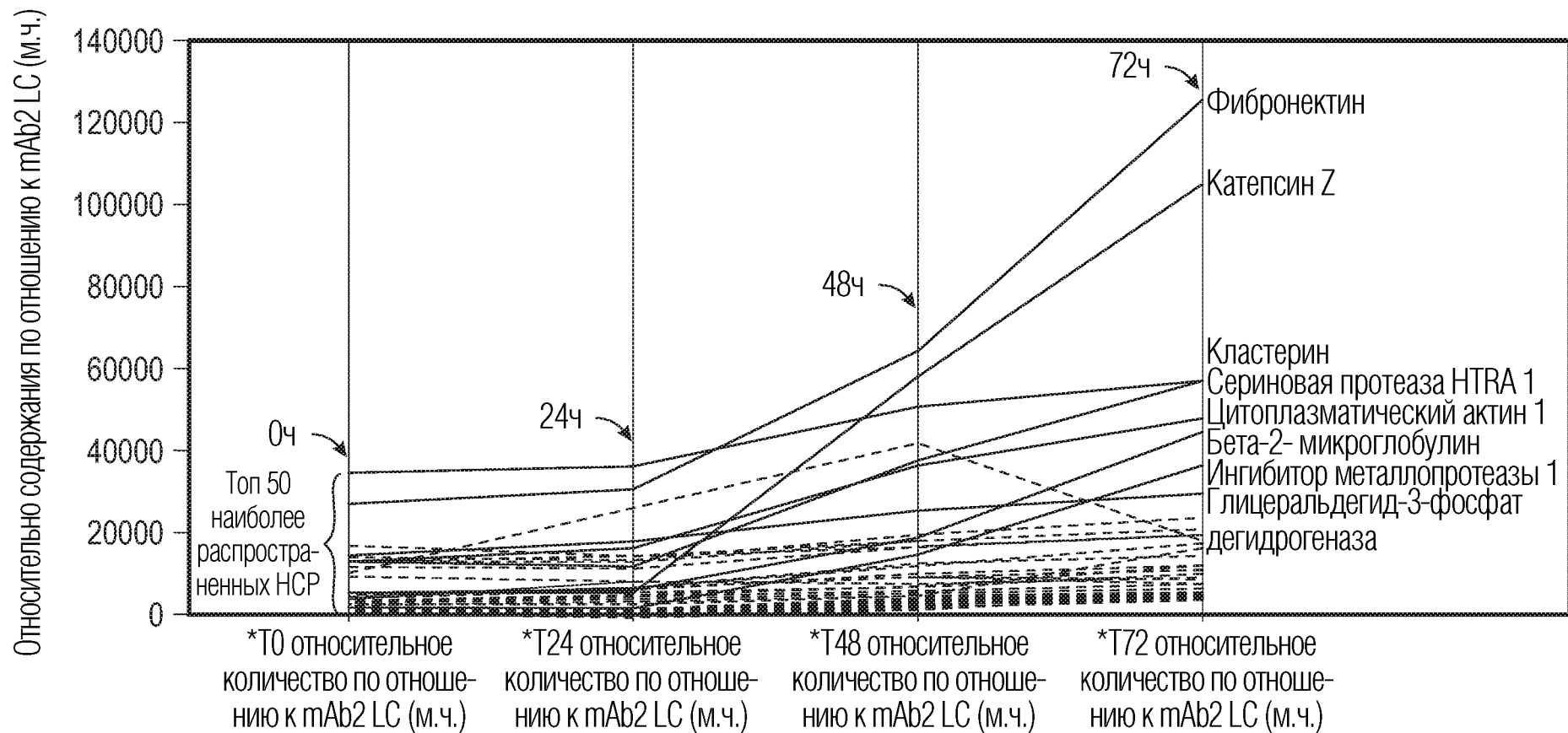
Фиг. 23



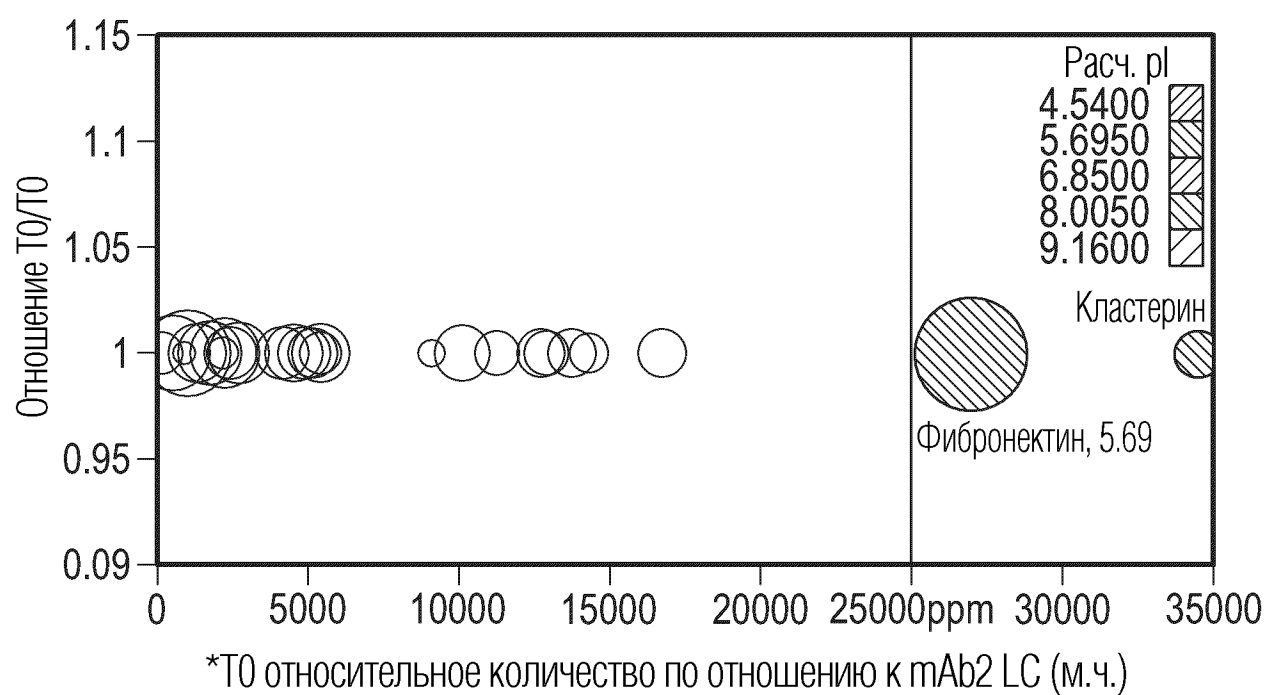
Фиг. 24







ФИГ. 26



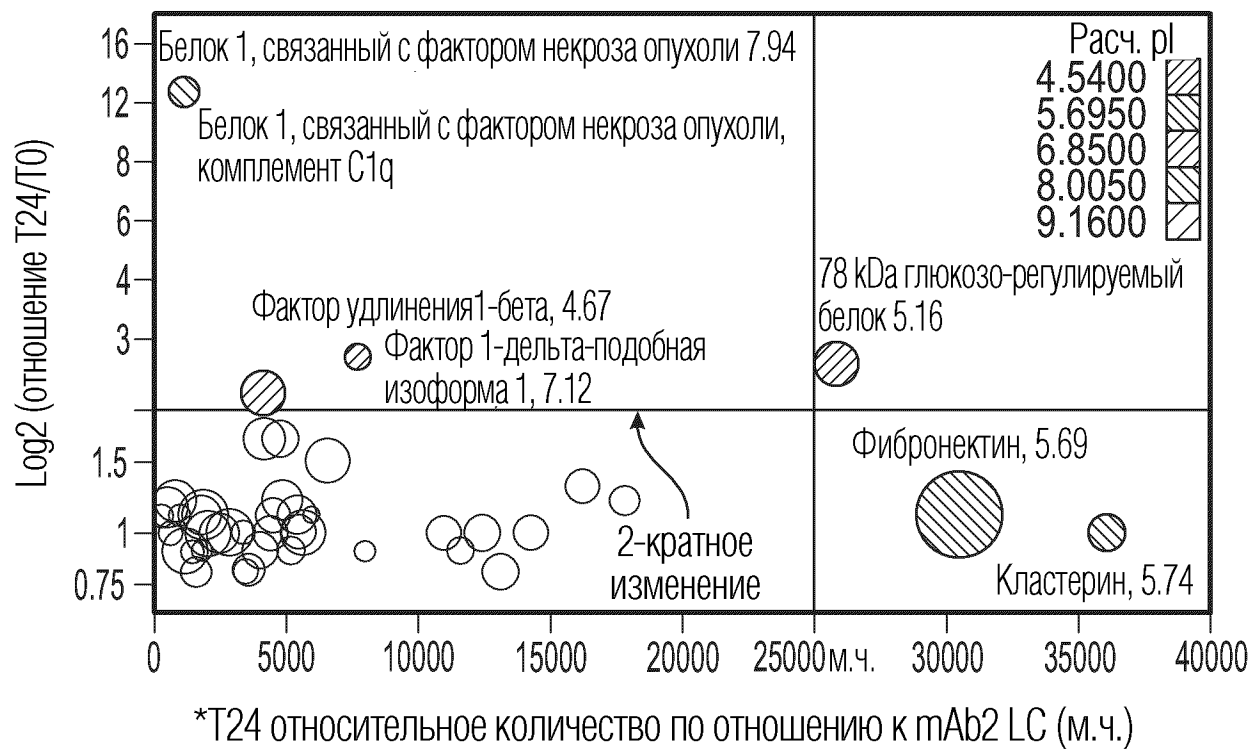
Ось Y = Log 2 кратное изменение количества белка увеличивающееся со временем

Ось X = Относительное содержание НРС

Размер круга = ММ белка

Окрашивание = рассчитанная pI

ФИГ. 27



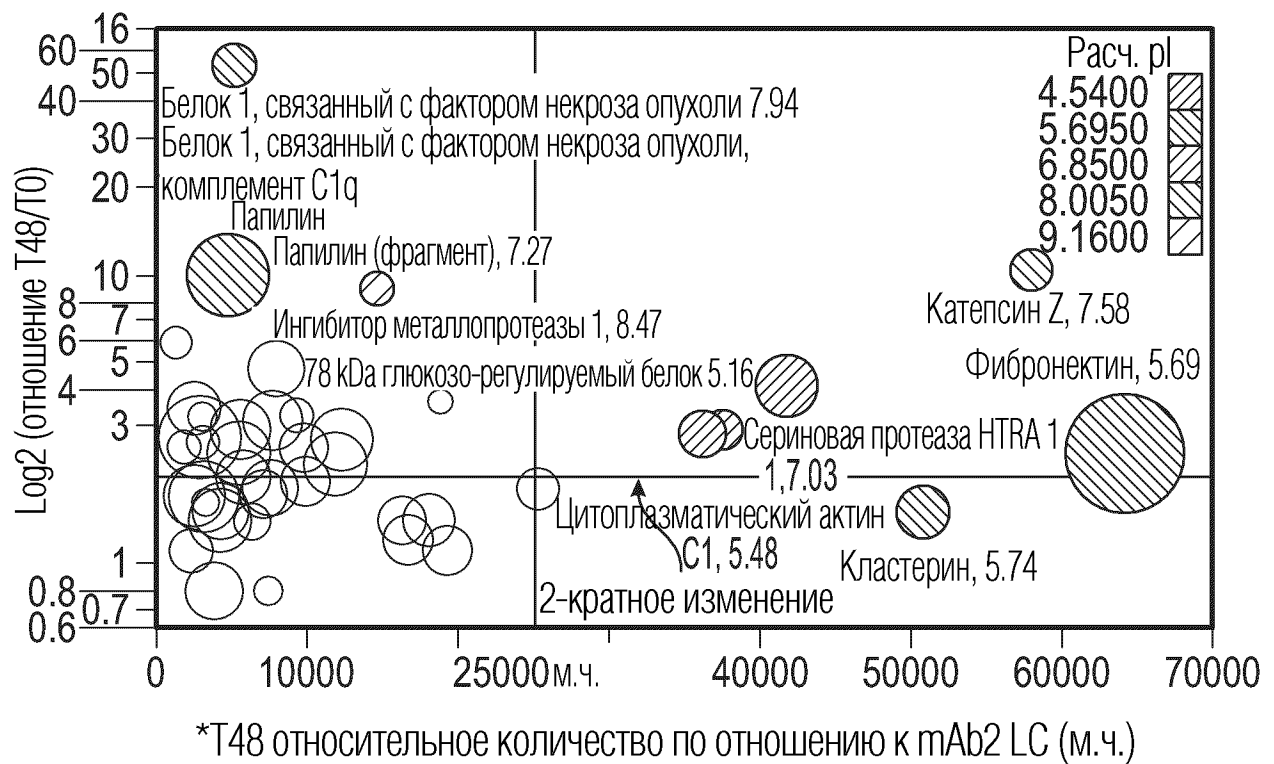
Ось Y = Log 2 кратное изменение количества белка увеличивающееся со временем

Ось X = Относительное содержание НРС

Размер круга = ММ белка

Окрашивание = рассчитанная pI

ФИГ. 28



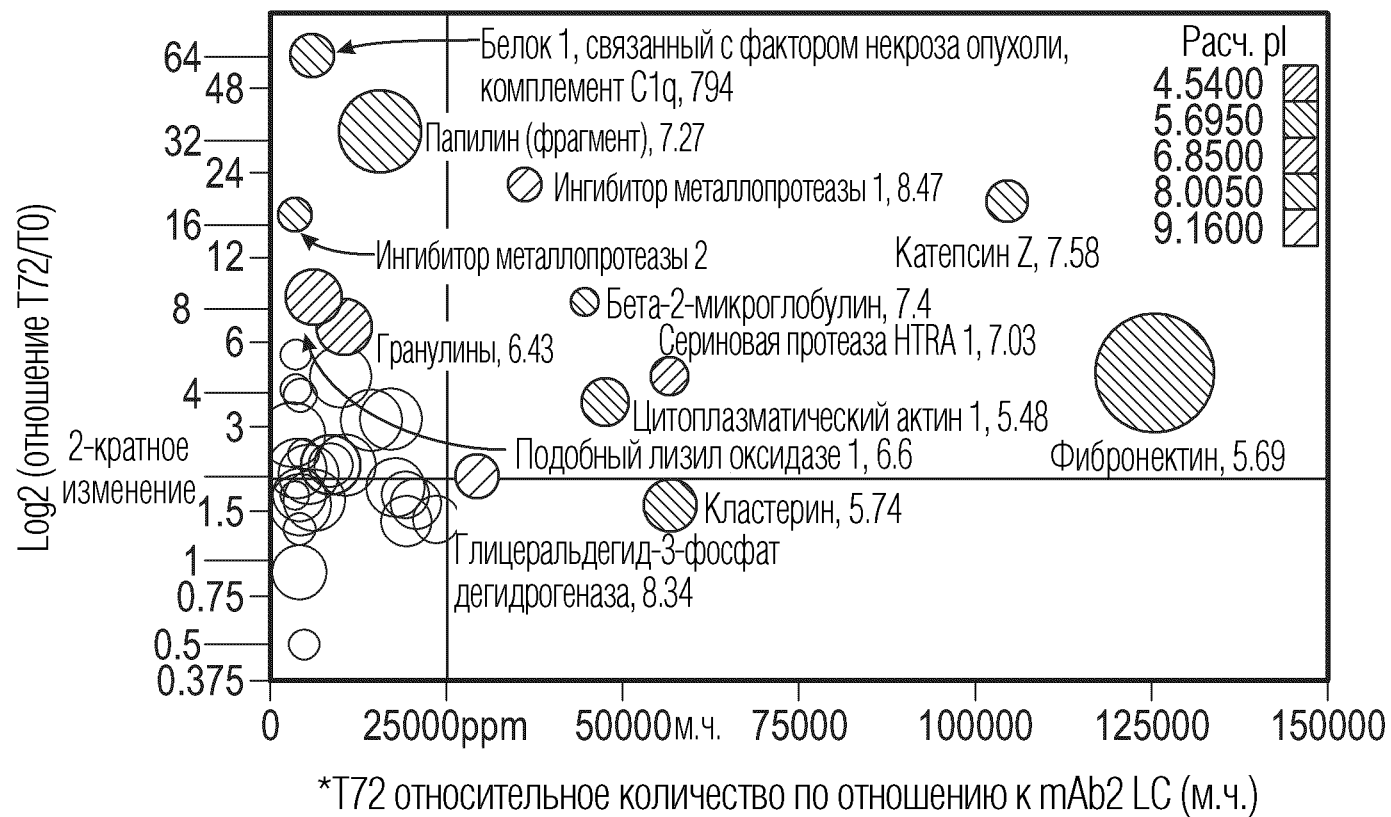
Ось Y = Log 2 кратное изменение количества белка увеличивающееся со временем

Ось X = Относительное содержание НРС

Размер круга = ММ белка

Окрашивание = рассчитанная pI

ФИГ. 29



Ось Y = Log 2 кратное изменение количества белка увеличивающееся со временем

Ось X = Относительное содержание НРС

Размер круга = MM белка

Окрашивание = рассчитанная pI

ФИГ. 30