

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290602 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.08

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

(22) Дата подачи заявки
2020.09.16

(54) СПОСОБЫ ЖХ-МС ДЛЯ ИЗОТИПИРОВАНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ

(31) 62/901,037; 63/064,868

(32) 2019.09.16; 2020.08.12

(33) US

(86) PCT/US2020/051083

(87) WO 2021/055486 2021.03.25

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

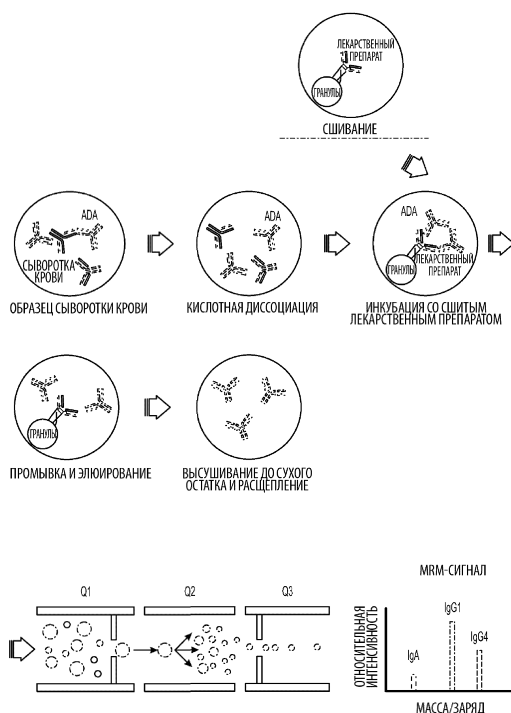
(72) Изобретатель:

Сюй Сяобинь, Хуан Сяосяо, Цю
Хайбо, Ли Нин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном изобретении предложены способы и системы для изотипирования и количественного определения антител, основанные на анализе с иммунозахватом и/или жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). Данные антитела индуцируются введением фармацевтических препаратов. Способ иммунозахвата включает контактирование образцов с твердой подложкой, при этом фармацевтический препарат сшит непосредственно с твердой подложкой. МС-анализ включает проведение пептидного картирования, отбор уникальных пептидов и фрагментных ионов для создания переходов ММР (мониторинга множественных реакций), оптимизацию энергии соударений и определение НПКО (нижнего предела количественного определения).



202290602

A1

A1

202290602

**СПОСОБЫ ЖХ-МС ДЛЯ ИЗОТИПИРОВАНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ****ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Данное изобретение в целом относится к способам и системам изотипирования и количественного определения антител, которые индуцируются введением фармацевтических препаратов. Данные способы и системы основаны на анализе с иммунозахватом и/или жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Существуют опасения по поводу эффективности лекарственных препаратов и безопасности для пациентов из-за присутствия антител, которые индуцируются введением фармацевтических препаратов, например индукция антител против лекарственных препаратов (ADA - anti-drug antibodies), поскольку ADA могут способствовать некоторым клиническим последствиям, таким как снижение эффективности лекарственного препарата, перекрестная реакция на эндогенные белки или изменение фармакокинетики терапевтических белков. FDA рекомендует применять подход, основанный на оценке рисков, для оценки и смягчения иммунных реакций в отношении неблагоприятных иммунологических реакций, связанных с терапевтическими белковыми продуктами, которые влияют на их безопасность и эффективность. (Отраслевое руководство: Оценка иммуногенности терапевтических белковых продуктов, август 2014 г., Министерство здравоохранения и социального обеспечения США, Управление по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов).

Информация о назначении и обзор клинической фармакологии FDA по 121 одобренному FDA биопрепарату были рассмотрены для оценки и представления данных об иммуногенности, включая моноклональные антитела, ферментные препараты, цитокины, факторы роста и токсины. Самая высокая частота сообщений была о случаях иммуногенности. Клиническая значимость ADA была неизвестна. В целом, наблюдалась поразительная конкорданция между увеличением системного клиренса препарата и снижением эффективности, связанной с ADA (Wang et al., Evaluating and Reporting the Immunogenicity Impacts for Biological Products-a Clinical Pharmacology Perspective. The AAPS Journal. 2016; 18(2): 395-403).

Биологическая сложность иммунных реакций создает проблемы для количественной оценки влияния ADA на фармакокинетику, поскольку фармакокинетическое воздействие может быть более чувствительным, чем конечные точки эффективности для оценки воздействий ADA.

Следует понимать, что существует потребность в способах характеристики ADA, таких как определение изотипов ADA и дальнейшее количественное определение наличия ADA. Данные способы могут предоставить ценную информацию о влиянии на иммуногенность в клинической фармакологии, имеющей отношение к фармакокинетики,

эффективности и безопасности введения лекарственных препаратов, такого как введение биологических препаратов.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Случаи иммуногенности белковых фармацевтических препаратов привели к растущему спросу на определение наличия антител, которые индуцируются введением белковых фармацевтических препаратов, например, антител против лекарственных препаратов (ADA). Данные о характеристиках ADA могут обеспечить понимание иммуногенности белковых фармацевтических препаратов для повышения безопасности лекарственных препаратов.

Иллюстративные варианты реализации данного изобретения, описанные в данном документе, удовлетворяют вышеупомянутым требованиям, предоставляя способы и системы для характеристики, идентификации и/или количественного определения антител, которые индуцируются введением фармацевтических препаратов. Способы и системы по данной заявке обеспечивают изотипирование и количественное определение ADA с использованием способов иммунозахвата и/или жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС).

В данном раскрытии, по меньшей мере, частично, предложен способ идентификации, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце, включающий: контактирование образца с твердой подложкой, при этом, по меньшей мере, один фармацевтический препарат был прикреплен к твердой подложке; промывание твердой подложки с использованием, по меньшей мере, одного раствора подвижной фазы для получения, по меньшей мере, одного элюента; выделение, по меньшей мере, одного пептида или белка из элюента; обработку выделенного пептида или белка раствором для денатурации и/или реакцию ферментативного расщепления для получения компонентов выделенного пептида или белка; идентификацию компонентов выделенного пептида или белка с помощью масс-спектрометра.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ идентификации, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце позволяет определить изотип или подкласс выделенного пептида или белка.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ идентификации, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце позволяет проводить количественную оценку выделенного пептида или белка с использованием масс-спектрометра.

В других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фармацевтический препарат в способе по данной заявке может представлять собой лекарственный препарат, химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственный препарат или белковый фармацевтический препарат.

В некоторых аспектах, по меньшей мере, один пептид или белок в способе по данной заявке может представлять собой антитело, которое избирательно связывается с

фармацевтическим препаратом, прикрепленным к твердой подложке.

В некоторых аспектах, когда, по меньшей мере, один пептид или белок в способе по данной заявке может представлять собой антитело человека, изотип антитела человека может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM или IgE.

В других аспектах, когда, по меньшей мере, один пептид или белок в способе по данной заявке может представлять собой антитело млекопитающего, изотип антитела млекопитающего может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM или IgA.

В еще других аспектах, когда, по меньшей мере, один пептид или белок в способе по данной заявке может представлять собой антитело человека, аминокислотная последовательность компонента выделенного пептида или белка может представлять собой GPSVFPLAPSSK, GLPAPIEK, WYVDGVEVHNAK, GLPSSIEK, DASGVTFWTWPSSGK, DASGATFTWTPSSGK, VSVFVPPR или DFTPPTVK.

В других аспектах, когда, по меньшей мере, один пептид или белок в способе по данной заявке может представлять собой антитело млекопитающего, аминокислотная последовательность компонента выделенного пептида или белка может представлять собой GPSVFPLAPSSR, GPSVFPLASCSR, GPSVFPLVSCSR, GPSVFPLASSSR, QIEVSWLR или DPSGATFTWTPSSGK.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения образец в способе по данной заявке может быть обработан раствором для достижения диапазона pH около 0,1-4,5 перед контактированием с твердой подложкой, при этом раствор содержит уксусную кислоту.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения образец в способе по данной заявке можно инкубировать с твердой подложкой при комнатной температуре в течение около 1 часа.

В некоторых аспектах образец в способе по данной заявке дополнительно содержит соль и поверхностно-активное вещество.

В других аспектах образец в способе по данной заявке дополнительно содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20), при этом образец имеет диапазон pH около 6-9.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения твердая подложка в способе по данной заявке может быть промыта с использованием, по меньшей мере, одного раствора подвижной фазы, который содержит соль и поверхностно-активное вещество, и, по меньшей мере, другого последующего раствора подвижной фазы, который имеет диапазон pH около 0,1-4,5.

В некоторых аспектах, по меньшей мере, один раствор подвижной фазы в способе по данной заявке содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20) и имеет диапазон pH

около 6-9.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения раствор для денатурации в способе по данной заявке содержит около 5-10 М мочевины.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фермент реакции ферментативного расщепления в способе по данной заявке может представлять собой трипсин.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фармацевтический препарат в способе по данной заявке может быть присоединен к твердой подложке с использованием реакции эпоксида с первичным амином или с использованием взаимодействия биотин-стрептавидин, при этом фармацевтический препарат может быть присоединен к твердой подложке путем поперечного сшивания с использованием остатка лизина фармацевтического препарата для реакции эпоксида с первичным амином.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения масс-спектрометр в способе по данной заявке может представлять собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или тройной квадрупольный масс-спектрометр, при этом масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии.

В некоторых аспектах масс-спектрометр в способе по данной заявке может выполнять анализы ЖК-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией) или ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций).

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения компонент выделенного пептида или белка в способе по данной заявке может составлять, по меньшей мере, около 0,01 нг, по меньшей мере, около 0,1 нг, по меньшей мере, около 0,2 нг или, по меньшей мере, около 0,3 нг.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ идентификации, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце может предусматривать количественную оценку выделенного пептида или белка с использованием масс-спектрометра, при этом способ дополнительно включает следующие этапы: проведение пептидного картирования выделенного пептида или белка, отбор уникальных пептидов и фрагментных ионов выделенного пептида или белка для создания переходов ММР (мониторинга множественных реакций), отбор двух или трех лучших переходов уникального пептида, оптимизация энергии соударений уникального пептида, последующее создание калибровочной кривой, и определение НПКО (нижнего предела количественного обнаружения) в соответствии с калибровочной кривой.

В данном раскрытии, по меньшей мере, частично, предложена система для идентификации или количественного определения, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце, включающая: твердую подложку, при этом фармацевтический препарат был прикреплен к твердой подложке; по меньшей мере, один раствор подвижной фазы для

промывки твердой подложки и способный обеспечить, по меньшей мере, один элюент, содержащий, по меньшей мере, один пептид или белок, для выделения, по меньшей мере, одного пептида или белка; раствор для денатурации и/или раствор для ферментативного расщепления, способный образовывать компоненты из выделенного пептида или белка; и масс-спектрометр, способный идентифицировать или количественно определять компоненты выделенного пептида или белка.

В некоторых аспектах масс-спектрометр в системе по данной заявке способен идентифицировать или количественно определять изотип или подкласс выделенного пептида или белка.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фармацевтический препарат в системе по данной заявке может представлять собой лекарственный препарат, химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство или белковый фармацевтический препарат.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения, по меньшей мере, один пептид или белок в системе по данной заявке может представлять собой антитело, которое избирательно связывается с фармацевтическим препаратом, прикрепленным к твердой подложке.

В некоторых аспектах, когда, по меньшей мере, один пептид или белок в системе по данной заявке может представлять собой антитело человека, изотип антитела человека может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM или IgE.

В некоторых аспектах, когда, по меньшей мере, один пептид или белок в системе по данной заявке может представлять собой антитело млекопитающего, изотип антитела млекопитающего может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM или IgA.

В других аспектах, когда, по меньшей мере, один пептид или белок в системе по данной заявке может представлять собой антитело человека, аминокислотная последовательность компонента выделенного пептида или белка может представлять собой GPSVFPLAPSSK, GLPAPIEK, WYVDGVEVHNAK, GLPSSIEK, DASGVTFWTPSSGK, DASGATFTWTPSSGK, VSVFVPPR или DFTPPTVK.

В других аспектах, когда, по меньшей мере, один пептид или белок в системе по данной заявке может представлять собой антитело млекопитающего, аминокислотная последовательность компонента выделенного пептида или белка может представлять собой GPSVFPLAPSSR, GPSVFPLASCSR, GPSVFPLVSCSR, GPSVFPLASSSR, QIEVSWLR или DPSGATFTWTPSSGK.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения образец в системе по данной заявке может быть обработан раствором для достижения диапазона pH около 0,1-4,5 перед контактированием с твердой подложкой, при этом раствор содержит уксусную кислоту.

В некоторых аспектах реализации данного изобретения образец в системе по данной заявке можно инкубировать с твердой подложкой при комнатной температуре в

течение около 1 часа.

В некоторых аспектах образец в системе по данной заявке дополнительно содержит соль и поверхностно-активное вещество.

В других аспектах образец в системе по данной заявке дополнительно содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20), при этом образец имеет диапазон pH около 6-9.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения твердая подложка в системе по данной заявке может быть промыта с использованием, по меньшей мере, одного раствора подвижной фазы, который содержит соль и поверхностно-активное вещество, и, по меньшей мере, другого последующего раствора подвижной фазы, который имеет диапазон pH около 0,1-4,5.

В некоторых аспектах, по меньшей мере, один раствор подвижной фазы в системе по данной заявке содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20) и имеет диапазон pH около 6-9.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения раствор для денатурации в системе по данной заявке содержит около 5-10 М мочевины.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фермент реакции ферментативного расщепления в системе по данной заявке может представлять собой трипсин.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фармацевтический препарат в системе по данной заявке может быть присоединен к твердой подложке с использованием реакции эпоксида с первичным амином или с использованием взаимодействия биотин-стрептавидин, при этом фармацевтический препарат может быть присоединен к твердой подложке путем поперечного сшивания с использованием остатка лизина фармацевтического препарата для реакции эпоксида с первичным амином.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения масс-спектрометр в системе по данной заявке может представлять собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или тройной квадрупольный масс-спектрометр, при этом масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии.

В некоторых аспектах масс-спектрометр в системе по данной заявке может выполнять анализы ЖК-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией) или ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций).

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения система

идентификации или количественного определения, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце может предусматривать: проведение пептидного картирования выделенного пептида или белка, отбор уникальных пептидов и фрагментных ионов выделенного пептида или белка для создания переходов ММР (мониторинга множественных реакций), отбор двух или трех лучших переходов уникального пептида, оптимизация энергии соударений уникального пептида, последующее создание калибровочной кривой, и определение НПКО (нижнего предела количественного обнаружения) в соответствии с калибровочной кривой.

Эти и другие аспекты изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении их вместе со следующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты реализации данного изобретения и его многочисленные конкретные детали, может быть дано в качестве иллюстрации, а не ограничения данного изобретения. Многие замены, модификации, добавления или перестройки могут быть выполнены в рамках объема данного изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Файл данного патента или заявки содержит, по меньшей мере, один графический материал, выполненный в цвете. Копии данного патента или опубликованная патентная заявка с цветным(и) графическим материалом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и за уплату необходимой пошлины.

На Фиг. 1 представлен отбор ионных продуктов из суррогатного пептида IgG1 обезьяны в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 2А и 2В представлен выбор 2 лучших переходов из суррогатного пептида IgG1 обезьяны и оптимизация энергии соударений в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. На Фиг. 2А представлена площадь пика ионных продуктов в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. На Фиг. 2В представлена выбранная энергия соударений в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 3 представлено определение предела чувствительности прибора с использованием тройного квадрупольного ЖХ-МС в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Были исследованы различные количества пептидов иммуноглобулинов, включая 0,3 нг, 0,9 нг, 3 нг, 9 нг, 30 нг, 90 нг и 300 нг. IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM и IgA обезьяны исследовали в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 4 представлена степень извлечения ADA с использованием гранул с биотинилированным лекарственным препаратом или гранул с сшитым лекарственным препаратом в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 5А и 5В представлено применение лекарственного препарата А или лекарственного препарата В для захвата ADA в присутствии денатурирующего раствора

для растворения высушенных ADA перед ферментативным расщеплением в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. На Фиг. 5A представлено использование лекарственного препарата А для захвата ADA без использования денатурирующего раствора для растворения высушенных ADA. На Фиг. 5B представлено использование лекарственного препарата А или лекарственного препарата В для захвата ADA в присутствии денатурирующего раствора для растворения высушенных ADA.

На Фиг. 6 представлено неспецифическое взаимодействие в присутствии сыворотки крови обезьяны в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 7 представлена оптимизация условий инкубации для иммунозахвата, включая условия инкубации, включая инкубацию при комнатной температуре в течение 1 часа или при 4 °C в течение ночи в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 8 представлена оптимизация условий инкубации для иммунозахвата с использованием IgG2 в качестве индикатора шума в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 9 представлена оптимизация захвата антитела иммунозахвата путем прерывания взаимодействий в сыворотке крови путем использования кислых условий в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Условие 1: добавить 1 мкл 5 М уксусной кислоты в 49 мкл сыворотки крови обезьяны, инкубировать в течение 1 часа (конечная концентрация уксусной кислоты 300 mM). Условие 2: добавить 50 мкл 600 mM уксусной кислоты в 50 мкл сыворотки крови обезьяны, инкубировать в течение 1 часа (конечная концентрация уксусной кислоты 300 mM).

На Фиг. 10 представлено использование Fab-областей лекарственных препаратов IgG для захвата ADA для оптимизации изотипирования и количественного определения ADA IgG4 в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Лекарственный препарат с только Fab-областью устраняет взаимодействия сывороточного IgG4 с Fc-областью лекарственных препаратов IgG4. Для IgG1 как полноразмерное антитело, так и только Fab-область имеют низкое неспецифическое связывание.

На Фиг. 11 представлено использование Fab-областей лекарственных препаратов IgG для захвата ADA для изотипирования и идентификации ADA IgM в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Результаты демонстрируют, что взаимодействие между сывороточным IgM и Fab-областью лекарственного препарата вызывает высокий фон IgM.

На Фиг. 12 изображены предпочтительные способы иммунозахвата, ферментативного расщепления и ЖХ-МС для изотипирования и количественного определения ADA в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 13 представлен диапазон исследования ADA для построения калибровочных кривых и определения порога чувствительности или предела

квантификации с использованием лекарственного препарата А или В до или после разработки способа иммунозахвата в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 14 представлено влияние различных концентраций лекарственного препарата А или В на количественный анализ и обнаружение ADA в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 15 представлены концентрации лекарственного препарата В в образцах сыворотки крови обезьяны А или В с течением времени в доклиническом токсикологическом исследовании в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 16 представлены измерения общего количества ADA у обезьян А и В в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Общее количество ADA у обезьян А и В измеряли с использованием способов иммунозахвата-ЖХ/МС по данной заявке, как представлено на Фиг. 16А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. Суммарное количество ADA у обезьян А и В измеряли с использованием анализа связывания с лигандом (АСЛ, LBA), как представлено на Фиг. 16В в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 17А и 17В представлены относительные количественные определения изотипов ADA, включая количества IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgA в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. На Фиг. 17А представлена количественная оценка для обезьяны А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения. На Фиг. 17В представлена количественная оценка для обезьяны В в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 18 представлены концентрации лекарственного препарата А в образцах сыворотки крови обезьян А, В и С, отслеживаемые в течение времени в доклиническом фармакокинетическом исследовании лекарственного препарата А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 19 представлены общие количества ADA у обезьян А, В и С, измеренные способами иммунозахвата-ЖХ/МС по данной заявке для изотипирования и количественного определения ADA в доклиническом фармакокинетическом исследовании на обезьянах для лекарственного препарата А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

На Фиг. 20 представлены относительные количественные определения изотипов ADA, включая количества IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgA, в доклиническом фармакокинетическом исследовании на обезьянах для лекарственного препарата А в соответствии с иллюстративным вариантом реализации данного изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Растущие опасения по поводу эффективности лекарственных препаратов и

безопасности пациентов из-за случаев иммуногенности белковых фармацевтических препаратов привели к увеличению потребности в характеристике антител против лекарственного препарата (ADA). Требования к характеристике ADA обусловлены, например, необходимостью понимания влияния ADA на снижение эффективности лекарственных препаратов, перекрестную реакцию на эндогенные белки или изменение фармакокинетики фармацевтических препаратов. Данные о характеристиках ADA могут предоставить ценную информацию об иммуногенности фармацевтических препаратов и, следовательно, повысить безопасность введения лекарственных препаратов.

В данном раскрытии предложены способы и системы для удовлетворения вышеупомянутых требований путем обеспечения способов и систем для характеристики, идентификации и/или количественного определения антител, которые индуцируются введением фармацевтических препаратов. Способы и системы по данной заявке обеспечивают изотипирование и количественное определение ADA с использованием способов иммунозахвата и/или жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). Данные способы и системы могут применяться в доклинических токсикологических или фармакокинетических исследованиях для мониторинга ADA в течение времени после введения фармацевтических препаратов путем изотипирования и количественного определения ADA.

Сообщалось о случаях, связанных с нейтрализующей активностью ADA, таких как влияние на иммуногенность в клинической фармакологии, имеющей отношение к фармакокинетике, эффективности и безопасности. Образование ADA во время медикаментозного лечения может вызывать снижение концентрации препарата в организме пациента, что может способствовать снижению эффективности. В организме пациента могут присутствовать различные ADA, способные связываться с различными участками лекарственных препаратов, такие как нейтрализующие или ненейтрализующие ADA. Нейтрализующие ADA способны связываться с активным участком молекулы лекарственного препарата, например, с участком связывания в молекуле лекарственного препарата для связывания с мишенью лекарственного препарата или с переменными областями антитела лекарственного препарата. Когда нейтрализующее ADA связывается с активным участком лекарственного препарата, оно делает лекарственный препарат неактивным. Нейтрализующее ADA может быть способно связываться с неактивным участком молекулы лекарственного препарата, таким как константная область или каркас молекулы антитела лекарственного препарата. Несмотря на то, что лекарственный препарат может оставаться активным при связывании с ненейтрализующими ADA, наличие ненейтрализующих ADA может способствовать определенным изменениям в клинической фармакологии.

Иммуногенность относится к склонности терапевтического препарата генерировать иммунные ответы на себя и на родственные белки, такие как индукция иммунологически связанных нежелательных клинических явлений. Соответствующая информация об иммуногенности включает индукцию связывающих антител, индукцию нейтрализующих

антител, изменение фармакокинетики, снижение эффективности и проблемы безопасности. Однако, клиническая значимость ADA была неизвестна. Кроме того, ограниченность имеющихся данных может препятствовать определению влияния ADA. ADA могут ассоциироваться с увеличением системного клиренса фармацевтических препаратов и снижением их эффективности. Некоторые лекарственные препараты содержали ADA, поддерживающие действие лекарственного препарата, что приводило к снижению клиренса, возможно, из-за образования комплекса ADA-лекарственный препарат, такого как ADA-связывание лекарственного препарата. (Wang et al., Evaluating and Reporting the Immunogenicity Impacts for Biological Products-a Clinical Pharmacology Perspective. The AAPS Journal. 2016; 18(2): 395-403).

Иммуноглобулины представляют собой гетеродимерные белки, состоящие из двух тяжелых и двух легких цепей. Иммуноглобулин имеет переменные домены, которые связывают антигены, и константные домены, определяющие эффекторные функции. Существует пять основных классов константных доменов тяжелой цепи. Каждый класс определяет изотипы IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. IgG можно подразделить на четыре подкласса, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgA можно подразделить на IgA1 и IgA2. Различные изотипы ADA могут вызывать разные иммунные ответы.

Изотип IgM ADA может образовываться при первом воздействии лекарственного препарата через 7 дней с концентрацией 1,5 мг/мл в сыворотке крови. Функция IgM включает первичный ответ и фиксированные комплементы. Мономер IgM может служить В-клеточным рецептором. Изотипы IgG ADA могут образовываться при повторном воздействии препарата через 25-35 дней с концентрацией 0,5-9 мг/мл в сыворотке крови. Функция IgG включает обеспечение основного антитела крови, нейтрализацию токсина и опсонизацию. Изотипы IgA ADA имеют концентрацию 0,5-3 мг/мл в сыворотке крови. IgA может секретироваться в слезы, слюну и слизь. Изотип IgE ADA имеет концентрацию 0,05 мг/мл в сыворотке крови. IgE обеспечивает аллергическую реакцию и антипаразитарную активность. Изотип IgD может обеспечивать В-клеточный рецептор. (Schroder WH, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. J Allergy Clin Immunol. 2010; 125(2): S41-S52)

FDA рекомендует разработать тесты изотипирования ADA, чтобы понять потенциальные иммунные реакции пациентов, особенно для случаев индукции ADA и последствий ответов ADA для безопасности и эффективности терапевтических белковых препаратов. Полезные тесты на присутствие антитела включают изотипирование, картирование эпитопов и оценку перекрестной реактивности для различения изотипов антител. (Отраслевое руководство FDA: Разработка и валидация анализов для тестирования иммуногенности терапевтических белковых препаратов, проект, 2016 г.)

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения предусмотрены способы и системы для изотипирования и количественного определения ADA с использованием способов иммунозахвата и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). Они удовлетворяют давно ощущаемую потребность в

характеристике антител, индуцированных введением лекарственных препаратов или белковых фармацевтических препаратов, которые можно использовать для изучения доклинической или клинической токсикологии и фармакокинетики.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ иммунозахвата сочетается с анализами ЖХ-МС для изотипирования и количественного определения ADA. Способ иммунозахвата включает стадию использования кислотной диссоциации для обработки образца сыворотки крови, содержащего ADA, при этом к образцу сыворотки добавляют кислый раствор для предотвращения агрегации или связывания компонентов в образце сыворотки, таких как эндогенные сывороточные антитела, белковые фармацевтические препараты, лекарственные препараты антител, предшествующие лекарственные препараты или ADA. Кислотная диссоциация образцов сыворотки крови обеспечивает превосходные преимущества снижения фоновых шумов для последующего анализа ЖХ-МС. Впоследствии ADA в образце сыворотки крови захватываются фармацевтическим препаратом, который может быть конъюгирован с твердой подложкой, например, гранулами, конъюгированными с лекарственным препаратом, или гранулами с лекарственным препаратом, при этом ADA могут избирательно связываться с фармацевтическим препаратом, при этом фармацевтический препарат может представлять собой лекарственный препарат, который индуцировал ADA после введения лекарственного препарата.

В некоторых аспектах ADA захватываются гранулами, конъюгированными с лекарственным препаратом, путем инкубации гранул, конъюгированных с лекарственным препаратом, и образцов сыворотки крови, содержащих ADA. Позже гранулы отделяют, например, с помощью магнита выделяют магнитные гранулы, конъюгированные с лекарственным препаратом. Выделенные гранулы промывают. Затем следует этап элюирования для выделения ADA. Выделенные ADA подвергаются ферментативному расщеплению, такому как расщепление трипсином. Уникальные пептиды каждого изотипа/подкласса ADA идентифицируют и количественно определяют с использованием способов ЖХ-МС или ЖХ-ММП-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций).

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения разрабатываются способы иммунозахвата для выделения ADA из образцов сыворотки крови обезьяны или человека, включая оптимизацию иммунозахвата для увеличения скорости извлечения ADA, минимизацию фоновых шумов, вызванных неспецифическими взаимодействиями, построение стандартных кривых для количественного определения и определение нижнего предела количественного определения (НПКО).

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения может быть разработан способ ЖХ-ММП-МС для изотипирования и количественного определения ADA, включая выбор уникального суррогатного пептида для каждого изотипа или подкласса антител обезьяны или человека, отбор количественных и подтверждающих пептидов для количественного анализа ММП (мониторинга

множественных реакций), разработку способа ММР на тройном квадрупольном масс-спектрометре и определение предела чувствительности прибора.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения выделенные ADA подвергают ферментативному расщеплению для получения комбинации пептидов. Комбинацию пептидов анализируют с помощью разработанного способа ЖХ-МС или ЖХ-ММР-МС для идентификации и количественного определения изотипов ADA. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения разработанный способ ЖХ-МС или ЖХ-ММР-МС дополнительно включает следующие этапы: выбор уникального суррогатного пептида для каждого изотипа, проведение пептидного картирования, отбор пептидов и фрагментных ионов для создания переходов ММР, отбор двух лучших или трех лучших переходов уникального пептида, оптимизация энергии соударений уникального пептида, последующее построение калибровочной кривой и определение предела чувствительности прибора в соответствии с калибровочной кривой. В некоторых аспектах пептидное картирование выполняют на QE plus (система ЖХ-МС/МС Q Exactive™ Plus Orbitrap от Thermo Fisher Scientific), а отбор двух или трех лучших переходов выполняют на тройном квадрупольном масс-спектрометре.

Способ, основанный на ЖХ-МС, может использоваться для идентификации и количественного определения изотипов антител, как указано в данной заявке, и выполняется на уровне пептидов для выяснения чувствительности анализа, включая этапы ферментативного расщепления и количественного определения антител-мишеней на основе выбранных сигнатурных уникальных пептидов, полученные из антител-мишеней.

Способы или системы по данной заявке обеспечивают преимущества генерирования наборов данных, которые позволяют последовательно идентифицировать и точно определять количество изотипов ADA в множестве образцов. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ или система по данной заявке обеспечивает способ, основанный на ММР, для надежного количественного определения изотипов ADA в низкой концентрации в сложных смесях. В подходах ММР заранее определенный ион-предшественник и один из его фрагментов выбираются двумя масс-фильтрами тройного квадрупольного прибора. Серия пар ионов-предшественников и фрагментных ионов, например, переходы, генерируются и контролируются с течением времени. Когда серия переходов сочетается со временем удерживания целевого пептида, это может обеспечить оптимальный анализ для точной количественной оценки. Анализ позволяет проводить количественную оценку большого количества пептидов в ходе одного эксперимента ЖХ-МС.

Учитывая ограничения существующих способов, был разработан эффективный и чувствительный способ идентификации и количественного определения ADA с помощью использования способов иммунозахвата и ЖХ-МС.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы,

подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при исследовании, далее следует описание конкретных способов и материалов. Все упомянутые публикации включены в данный документ посредством ссылки.

Термин в единственном числе следует понимать как означающий «по меньшей мере, один»; и термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, понятные специалистам в данной области техники; и в случаях, когда указаны диапазоны, то конечные точки включены в него.

Используемые в контексте данного документа термины «включать», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера и их следует понимать как означающие «содержать», «содержит» и «содержащий», соответственно.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в раскрытии предложен способ идентификации и/или количественного определения, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце, включающий: контактирование образца с твердой подложкой, при этом, по меньшей мере, один фармацевтический препарат был прикреплен к твердой подложке; промывание твердой подложки с использованием, по меньшей мере, одного раствора подвижной фазы для получения, по меньшей мере, одного элюента; выделение, по меньшей мере, одного пептида или белка из элюента; обработку выделенного пептида или белка раствором для денатурации и/или реакцию ферментативного расщепления для получения компонентов выделенного пептида или белка; идентификацию компонентов выделенного пептида или белка с помощью масс-спектрометра.

Используемый в контексте данного документа термин «пептид» или «белок» включает любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или более полимерных цепей аминокислот, широко известных в данной области техники как «пептид» или «полипептиды». Белок может содержать один или более полипептидов для формирования одной функционирующей биомолекулы. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, белок клетки-хозяина или их комбинации.

Используемый в контексте данного документа термин «фармацевтический препарат» включает активный компонент, который может быть полностью или частично биологическим по своей природе или обладающим фармацевтической активностью. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фармацевтический препарат может содержать лекарственный препарат, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственный препарат, Fc-область антитела, ферментный препарат, цитокин, фактор роста, белковый фармацевтический препарат, токсин, нуклеиновую кислоту, ДНК, РНК, химическое соединение, клетку, ткань или любой фармацевтический компонент, способный индуцировать антитела у субъекта.

Используемый в контексте данного документа термин «денатурирующий раствор» включает щелочной раствор, раствор кислоты или раствор, содержащий мочевины, хлорид гуанидиния, окислители, восстановители или органические растворители.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения фармацевтический препарат по данной заявке может представлять собой лекарственный препарат, химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство или белковый фармацевтический препарат.

Используемый в контексте данного документа термин «белковый фармацевтический препарат» включает активный компонент, который может быть полностью или частично биологическим по своей природе. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белковый фармацевтический препарат может содержать пептид, белок, слитый белок, антитело, антиген, вакцину, конъюгат пептид-лекарственный препарат, конъюгат антитело-лекарственный препарат, конъюгат белок-лекарственный препарат, клетки, ткани или их комбинации. В некоторых других иллюстративных вариантах реализации данного изобретения белковый фармацевтический препарат может содержать рекомбинантную, сконструированную, модифицированную, мутантную или усеченную версию пептида, белка, слитого белка, антитела, антигена, вакцины, конъюгата пептид-лекарственный препарат, конъюгата антитело-лекарственный препарат, конъюгата белок-лекарственный препарат, клеток, тканей или их комбинаций.

Используемый в контексте данного документа термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, Fc-фрагмент, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, dsFv-димер, dAb-фрагмент, Fd'-фрагмент, Fd-фрагмент и изолированную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триангела, тетрагела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Fv-фрагменты представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а ScFv-белки 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 ферментативным или химическим путем с помощью фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела необязательно может содержать фрагмент одноцепочечного антитела. Альтернативно или дополнительно, фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела необязательно может содержать

мультимолекулярный комплекс.

Используемый в контексте данного документа термин «конъюгат антитело-лекарственный препарат» или «ADC» может относиться к антителу, присоединенному к биологически активному лекарственному препарату (препаратам) с помощью линкера (линкеров) с лабильной связью (связями). ADC может содержать несколько молекул биологически активного лекарственного препарата (или нагрузки), которые могут быть ковалентно связаны с боковыми цепями аминокислотных остатков антитела (Siler Panowski et al., Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy, 6 mAbs 34-45 (2013)). Антитело, используемое для ADC, может быть способно связываться с достаточной аффинностью для селективного накопления и длительного удержания в сайте-мишени. Большинство ADC могут иметь значения K_d в наномолярном диапазоне. Полезная нагрузка может иметь активность в наномолярном/пикомолярном диапазоне и может достигать внутриклеточных концентраций, достижимых после распределения ADC в ткани-мишени. И наконец, линкер, который образует связь между полезной нагрузкой и антителом, может быть достаточно стабильным в циркуляции, чтобы использовать преимущества фармакокинетических свойств фрагмента антитела (например, длительный период полувыведения) и позволить полезной нагрузке оставаться прикрепленной к антителу по мере его распределения в тканях, но должен обеспечивать эффективное высвобождение биологически активного лекарственного препарата после того, как ADC может быть поглощен клетками-мишенями. Линкер может представлять собой: линкер, который не расщепляется во время клеточного процессинга, и линкер, который расщепляется, когда ADC достигает сайта-мишени. В случае нерасщепляемых линкеров биологически активный лекарственный препарат, высвобождаемый в ходе распознавания, содержит полезную нагрузку и все элементы линкера, все еще присоединенные к аминокислотному остатку антитела, обычно к остатку лизина или цистеина, после полного протеолитического расщепления ADC внутри лизосомы. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, структура которых включает сайт расщепления между полезной нагрузкой и сайтом присоединения аминокислоты на антителе. Механизмы расщепления могут включать гидролиз кислотолабильных связей в кислых внутриклеточных компартментах, ферментативное расщепление амидных или сложноэфирных связей внутриклеточной протеазой или эстеразой и восстановительное расщепление дисульфидных связей восстановительной средой внутри клеток.

В некоторых аспектах, по меньшей мере, один пептид или белок в образце по данной заявке может представлять собой антитело, которое избирательно связывается с фармацевтическим препаратом, прикрепленным к твердой подложке.

Используемый в контексте данного документа термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три

домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает, но не ограничивается ими, антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. IgG включает подмножество антител.

В некоторых аспектах способ или система по данной заявке могут быть использованы для идентификации или количественного определения, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце, и способ дополнительно включает следующие этапы: проведение пептидного картирования выделенного пептида или белка, отбор уникальных пептидов и фрагментных ионов выделенного пептида или белка для создания переходов ММР (мониторинга множественных реакций), отбор двух или трех лучших переходов уникального пептида, оптимизация энергии соударений уникального пептида, последующее создание калибровочной кривой, и определение НПКО (нижнего предела количественного обнаружения) в соответствии с калибровочной кривой.

Используемый в контексте данного документа термин «пептидное картирование» относится к технологии установления первичной структуры белка, например последовательности аминокислот. Пептидное картирование можно использовать для идентификации, первичной структурной характеристики и обеспечения/контроля качества (QA/QC). Неизвестный представляющий интерес белок может быть сначала расщеплен на более мелкие пептиды, абсолютные массы которых могут быть точно измерены с помощью масс-спектрометра, например, путем сочетания жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) на основе платформы пептидного картирования для установления первичной структуры белка.

В некоторых аспектах масс-спектрометр в способе или системе по данной заявке может представлять собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или тройной квадрупольный масс-спектрометр, масс-спектрометр способен выполнять анализы ЖХ-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией) или ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций).

Используемый в контексте данного документа термин «масс-спектрометр» включает устройство, способное идентифицировать конкретные виды молекул и измерять их точные массы. Подразумевается, что данный термин включает любой молекулярный

детектор, в котором полипептид или пептид может быть элюирован для обнаружения и/или характеристики. Масс-спектрометр может состоять из трех основных частей: источника ионов, масс-анализатора и детектора. Роль источника ионов заключается в создании ионов газовой фазы. Атомы, молекулы или кластеры определяемого соединения могут переводиться в газовую фазу и ионизироваться одновременно (как при ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов сильно зависит от области применения.

Используемый в контексте данного документа термин «жидкостная хроматография» относится к процессу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью или газом, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального распределения химических объектов при их обтекании или омывании неподвижной жидкой или твердой фазы. Неограничивающие примеры хроматографии включают традиционную обращенно-фазовую (ОФ), ионообменную (ИО), хроматографию со смешанным режимом и нормально-фазовую хроматографию (НФ).

Используемый в контексте данного документа термин «ионизация электрораспылением» или «ИЭР» («ESI») относится к процессу ионизации распылением, при котором либо катионы, либо анионы в растворе переходят в газовую фазу посредством образования и десольватации при атмосферном давлении потока высокозаряженных капель, возникающих в результате приложения разности потенциалов между кончиком иглы электрораспылителя, содержащей раствор, и противоэлектродом. Обычно существует три основных этапа образования ионов в газовой фазе из ионов электролита в растворе. К ним относятся: (а) образование заряженных капель на инфузионном конце ЭР; (б) сжатие заряженных капель за счет испарения растворителя и повторяющихся распадов капель, приводящих к образованию небольших сильно заряженных капель, способных образовывать ионы в газовой фазе; и (с) механизм образования ионов в газовой фазе из очень маленьких и сильно заряженных капель. Этапы (а)-(с) обычно происходят в области атмосферного давления аппарата. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может представлять собой масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

Используемый в контексте данного документа термин «тройной квадрупольный масс-спектрометр» относится к тандемному масс-спектрометру, состоящему из двух последовательно соединенных квадрупольных масс-анализаторов с (не разделяющей по массе) радиочастотой (РЧ), только квадруполь между ними действует как ячейка для диссоциации, индуцированной соударением. В тройном квадрупольном масс-спектрометре образец пептида вводят в ЖХ, соединенный с прибором МС. Первый квадруполь можно использовать в качестве масс-фильтра для выделения пептидов с целевым значением m/z (*масса/заряд*). Второй квадруполь служит ячейкой соударений для разрыва пептида на фрагменты. Третий квадруполь служит вторым масс-фильтром для заданных значений m/z фрагментов первичного исходного пептида. Используемый в данном документе термин «тандемная масс-спектрометрия» включает способ, при

котором структурная информация о молекулах образца может быть получена с использованием нескольких этапов отбора по массам и разделения изотопов. Необходимым условием является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в неизменном виде, а также что их можно заставить распасться некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массе. Многоэтапная МС/МС, или МСⁿ, может быть выполнена путем выбора и выделения иона-предшественника (MS²), его фрагментации, выделения первичного иона-фрагмента (MS³), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (MS⁴) и т.д. до тех пор, пока можно будет получить значимую информацию или можно будет обнаружить сигнал фрагментного иона. Тандемная МС успешно выполнялась с широким спектром комбинаций анализаторов. Какие анализаторы комбинировать для определенного применения, может определяться многими различными факторами, такими как чувствительность, селективность и скорость, а также размером, стоимостью и доступностью. Двумя основными категориями тандемных способов МС являются тандемный анализ масс в пространстве и тандемный во времени анализ масс, но существуют также гибриды, в которых анализаторы для тандемного во времени анализа масс соединены с анализом масс в пространстве или с анализаторами для тандемного анализа масс в пространстве. Масс-спектрометр с тандемным анализом масс в пространстве включает в себя источник ионов, устройство активации ионов-предшественников и, по меньшей мере, два масс-анализатора без ионной ловушки. Конкретные функции разделения m/z могут быть разработаны таким образом, что в одной секции прибора ионы отбираются, диссоциируются в промежуточной области, а затем ионные продукты передаются в другой анализатор для разделения по m/z и сбора данных. В масс-спектрометре с тандемным во времени анализом масс ионы, образующиеся в источнике ионов, могут быть захвачены, изолированы, фрагментированы и разделены по m/z в одном и том же физическом устройстве.

Идентифицированные масс-спектрометром пептиды могут быть использованы в качестве суррогатных представителей интактного белка и его посттрансляционных модификаций. Их можно использовать для характеристики белков путем сопоставления экспериментальных и теоретических данных МС/МС, при этом последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Характеристика может включать, но не ограничиваться этим, секвенирование аминокислот белковых фрагментов, определение последовательности белка, определение последовательности белка *de novo*, обнаружение посттрансляционных модификаций или идентификацию посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения определяют изотип или подкласс выделенного пептида или белка.

Используемый в данном документе термин «изотип» или «подкласс» относится к различным изотипам иммуноглобулинов. Иммуноглобулины представляют собой гетеродимерные белки, состоящие из двух тяжелых и двух легких цепей.

Иммуноглобулин имеет переменные домены, которые связывают антигены, и константные домены, определяющие эффекторные функции. Fc-область тяжелых цепей определяет класс антител, которых у млекопитающих пять: IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Классы отличаются своими биологическими свойствами, также известными как эффекторные функции, и их функциональной локализацией для обеспечения соответствующего иммунного ответа на данный антиген. Существует пять основных классов константных доменов тяжелой цепи. Каждый класс определяет изотипы IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. IgG можно подразделить на четыре подкласса, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgA можно подразделить на IgA1 и IgA2. Когда антитело может представлять собой антитело человека, изотипом антитела человека может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM или IgE. Когда антитело представляет собой антитело обезьяны, изотип антитела обезьяны может представлять собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM или IgA.

Иллюстративные варианты реализации данного изобретения

В вариантах реализации данного изобретения, описанных в данном документе, предложены композиции, способы и системы для идентификации и количественного определения изотипов или подклассов антител с помощью использования способа, основанного на иммунозахвате и масс-спектрометрии.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в раскрытии предложен способ идентификации и/или количественного определения, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце, включающий: контактирование образца с твердой подложкой, при этом, по меньшей мере, один фармацевтический препарат был прикреплен к твердой подложке; промывание твердой подложки с использованием, по меньшей мере, одного раствора подвижной фазы для получения, по меньшей мере, одного элюента; выделение, по меньшей мере, одного пептида или белка из элюента; обработку выделенного пептида или белка раствором для денатурации и/или реакцию ферментативного расщепления для получения компонентов выделенного пептида или белка; идентификацию компонентов выделенного пептида или белка с помощью масс-спектрометра.

В некоторых аспектах образец в системе по данной заявке может быть обработан кислым раствором для достижения диапазона pH около 0,1-4,5 перед контактированием с твердой подложкой. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения кислый раствор имеет диапазон pH около 3,6, около 0,1-3,6, около 1,0-4,0, около 2,0-4,0, около 3,0-4,0, около 1,5-4, около 2,5-4 или около 3,5-4,0. В некоторых аспектах кислый раствор содержит уксусную кислоту, фосфорную кислоту, борную кислоту, лимонную кислоту, угольную кислоту, соляную кислоту, азотную кислоту, серную кислоту, плавиковую кислоту или щавелевую кислоту.

В других аспектах образец в способе или системе по данной заявке может быть инкубирован с твердой подложкой при комнатной температуре (температуре окружающей среды) в течение около 1 часа, около 5-60 минут, около 5 минут, около 10 минут, около 20

минут, около 30 минут, около 40 минут, около 50 минут, около 0,5-6 часов, около 0,5-1,5 часов, около 1,5 часов, около 2 часов, около 3 часов, около 6 часов, около 12 часов или в течение ночи. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения образец в способе или системе по данной заявке может быть инкубирован с твердой подложкой при около 4-30 °С в течение около 1 часа, около 5-60 минут, около 5 минут, около 10 минут, около 20 минут, около 30 минут, около 40 минут, около 50 минут, около 0,5-6 часов, около 0,5-1,5 часов, около 1,5 часов, около 2 часов, около 3 часов, около 6 часов, около 12 часов или в течение ночи. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения образец в способе или системе по данной заявке может быть инкубирован с твердой подложкой при около 4 °С в течение около 1 часа, около 5-60 минут, около 5 минут, около 10 минут, около 20 минут, около 30 минут, около 40 минут, около 50 минут, около 0,5-6 часов, около 0,5-1,5 часов, около 1,5 часов, около 2 часов, около 3 часов, около 6 часов, около 12 часов или в течение ночи.

В некоторых аспектах твердая подложка в способе или системе по данной заявке может представлять собой гранулы, магнитные гранулы, хроматографические смолы, полимер или хроматографическую матрицу.

В других аспектах образец в способе или системе по данной заявке дополнительно содержит соль и поверхностно-активное вещество. В других аспектах образец в способе или системе по данной заявке дополнительно содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), NEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20), при этом образец имеет диапазон pH около 6-9.

В некоторых аспектах твердая подложка в способе или системе по данной заявке может быть промыта с использованием, по меньшей мере, одного раствора подвижной фазы, который содержит соль и поверхностно-активное вещество, и, по меньшей мере, другого последующего раствора подвижной фазы, который имеет диапазон pH от около 0,1 до 4,5. В других аспектах, по меньшей мере, один раствор подвижной фазы в способе или системе по данной заявке содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), NEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20) и имеет диапазон pH около 6-9.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения раствор для денатурации в способе или системе по данной заявке содержит около 8 М, около 5-10 М, около 7-9 М, около 6-9 М или около 3-10 М мочевины. В некоторых аспектах раствор для денатурации может представлять собой щелочной раствор или кислый раствор. В других аспектах раствор для денатурации содержит мочевины, хлорид гуанидиния, окислители, восстановители или органические растворители.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения компонент выделенного пептида или белка в способе или системе по данной заявке может составлять, по меньшей мере, около 0,01 нг, по меньшей мере, около 0,1 нг, по меньшей

мере, около 0,2 нг или, по меньшей мере, около 0,3 нг, около 0,01-1,0 нг, около 0,2-0,4 нг, около 0,2-0,5 нг или около 0,2-0,6 нг.

В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в раскрытии предложена система для идентификации или количественного определения, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце, включающая: твердую подложку, при этом фармацевтический препарат был прикреплен к твердой подложке; по меньшей мере, один раствор подвижной фазы для промывки твердой подложки и способный обеспечить, по меньшей мере, один элюент, содержащий, по меньшей мере, один пептид или белок, для выделения, по меньшей мере, одного пептида или белка; раствор для денатурации и/или раствор для ферментативного расщепления, способный образовывать компоненты из выделенного пептида или белка; и масс-спектрометр, способный идентифицировать или количественно определять компоненты выделенного пептида или белка. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения масс-спектрометр системы способен выполнять анализы ЖК-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией) или ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций). В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения система предусматривает: проведение пептидного картирования, отбор уникальных пептидов и фрагментных ионов для создания переходов ММР (мониторинга множественных реакций), отбор двух или трех лучших переходов, оптимизацию энергии соударений, последующее создание калибровочной кривой, и определение НПКО (нижнего предела количественного обнаружения) в соответствии с калибровочной кривой.

В некоторых аспектах НПКО включает предел чувствительности (ПЧ) или предел квантификации (ПК). В других аспектах ПЧ для идентификации или количественного определения пептида или белка в образце может составлять около 40 нг/мл, около 10-80 нг/мл, около 20-50 нг/мл, около 30-60 нг/мл или около 35-45 нг/мл. В других аспектах ПК для идентификации или количественного определения пептида или белка в образце может составлять около 120 нг/мл, около 80-160 нг/мл, около 100-140 нг/мл или около 110-130 нг/мл.

Следует понимать, что система не ограничивается какими-либо из вышеупомянутых фармацевтических препаратов, пептидов, белков, антител, антител против лекарственных препаратов, комплексов антиген-антитело, белковых фармацевтических продуктов, хроматографической колонкой или масс-спектрометром.

Последовательная маркировка этапов способа цифрами и/или буквами, как предложено в данном документе, не предназначена для ограничения способа или любых вариантов его реализации конкретным указанным порядком.

Различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи цитируются по всему описанию изобретения. Каждая из этих цитируемых ссылок включена в данный документ в полном объеме и для любых целей посредством ссылки.

Раскрытие будет более полно понято со ссылкой на следующие Примеры, которые предложены для более подробного описания данного раскрытия. Они предназначены для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие объем данного раскрытия.

ПРИМЕРЫ

Подготовка материалов и реагентов

1.1. Лекарственные препараты антител для захвата ADA. Для захвата ADA из образцов сыворотки крови человека или обезьяны использовали несколько лекарственных препаратов антител, как указано в Таблице 1.

Таблица 1. Лекарственные препараты антител для захвата ADA

Лекарственный препарат антител	Изотип (человека)	Антиген
Лекарственный препарат А	IgG4	PD1 (Белок запрограммированной гибели клеток 1)
Лекарственный препарат В	IgG4	INHBA (Ингибин, бета-цепь А)
Лекарственный препарат С	IgG4	ANGPTL3 (Родственный ангиопозтину белок 3)
Лекарственный препарат D	IgG1	PCSK9 (Пропротеиновая конвертаза субтилизин/кексинового типа 9)
Лекарственный препарат E	IgG1	Слитый Белок РСВ (респираторно-синцитиального вируса)
Лекарственный препарат F	Fab-область IgG4	PD1 (Белок запрограммированной гибели клеток 1)
Лекарственный препарат G	Fab-область IgG4	INHBA (Ингибин, бета-цепь А)
Лекарственный препарат H	Fab-область IgG4	ANGPTL3 (Родственный ангиопозтину белок 3)
Лекарственный препарат I	Fab-область IgG1	PCSK9 (Пропротеиновая конвертаза субтилизин/кексинового типа 9)
Лекарственный препарат J	Fab-область IgG1	Слитый Белок РСВ (респираторно-синцитиального вируса)

2.1. Конъюгация лекарственных препаратов антител с магнитными гранулами. Два типа способов конъюгации использовали для включения лекарственного

препарата антител в твердую подложку, такую как магнитная гранула. В первом способе лекарственный препарат антитела биотинилировали с использованием набора для биотинилирования, такого как набор для биотинилирования EZ-Link SulfoN-HS-LC. (Chen et al., Development of Immunocapture-LC/MS Assay for Simultaneous ADA Isotyping and Semiquantitation, Journal of Immunology Research, Volume 2016, Article ID 7682472, 14 страниц; Roos et al., Detection of cynomolgus monkey anti-protein XYZ anti-body using immunocapture-LC/MS, Journal of Applied Bioanalysis, October 2016, Vol 2, No. 4, p. 117-128). Биотинилированные лекарственные препараты впоследствии связывали с магнитными гранулами, покрытыми стрептавидином. Во втором способе лекарственные препараты антител сшивали непосредственно с магнитными гранулами с использованием реакции эпоксида с первичным амином через лизиновый остаток лекарственного препарата. Биотинилированные лекарственные препараты или сшитые лекарственные препараты использовались для захвата и выделения ADA в образцах сыворотки крови человека или обезьяны. Для удаления магнитных гранул из образца сыворотки крови использовали магнит.

3.1. Положительный контроль ADA. Моноклональное антитело IgG1 обезьяны против легкой каппа-цепи человека использовали в качестве положительного контроля ADA, например, ADA-Std, для разработки анализа иммунозахвата и ЖХ-МС для изотипирования и количественного определения ADA. ADA-Std может связываться с IgG человека.

Инструмент для идентификации и количественного определения пептидов. Масс-спектрометр для идентификации или количественного определения пептидов представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением или масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением. Масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии. Масс-спектрометр способен выполнять анализы ЖК-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией) или ЖХ-ММП-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций). В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения масс-спектрометр представляет собой тройной квадрупольный масс-спектрометр.

Пример 1. Выбор уникального суррогатного пептида для идентификации и количественного определения изотипа ADA

Идентификация и количественная оценка изотипов ADA с помощью ЖХ-МС были основаны на уникальных суррогатных пептидах ADA, а не на их полноразмерных молекулах при рассмотрении чувствительности обнаружения. Каждое ADA дает комбинацию пептидов при расщеплении трипсином. Только несколько репрезентативных пептидов на ADA предназначены для определения наличия ADA и количественного определения изотипов (V. Lange, P. Picotti, B. Domon, and R. Aebersold, Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial, Molecular Systems Biology, vol. 4, article 222, 2008).

Количественное измерение основано на наличии количественной взаимосвязи между ADA и его суррогатным пептидом путем идентификации соответствующих пептидов, которые были уникальными для каждого изотипа антител. Чтобы выбрать подходящий суррогатный пептид для каждого изотипа антитела, суррогатный пептид каждого изотипа должен происходить из константной области антитела. ADA одного и того же изотипа имеют разные формы с точки зрения аминокислотной последовательности в переменных областях, однако они имеют одинаковую константную область. Кроме того, выбранный суррогатный пептид является уникальным для каждого изотипа ADA и не должен образовываться ни в каких других изотипах. (Chen et al., Development of Immunocapture-LC/MS Assay for Simultaneous ADA Isotyping and Semiquantitation, *Journal of Immunology Research*, Volume 2016, Article ID 7682472, 14 страниц). Кроме того, суррогатные пептиды не должны содержать аминокислот полиморфных остатков аллотипа ADA (M.-P. Lefranc and G. Lefranc, Human Gm, Km, and Am allotypes and their molecular characterization: a remarkable demonstration of polymorphism, *Methods in Molecular Biology*, vol. 882, pp. 635-680, 2012). Поскольку многие изотипы имеют одни и те же легкие цепи ($\square$ и $\square$), легкие цепи были исключены при выборе суррогатных пептидов.

Есть несколько рекомендаций относительно выбора суррогатных пептидов. Избегайте пептидов, содержащих метионин, которые склонны к окислению. Избегайте пептидных последовательностей, содержащих аргинин-аргинин (RR) и лизин-лизин (KK), которые могут привести к нестабильному триптическому гидролизу. Пептидные последовательности, содержащие аргинин-пролин (RP) и лизин-пролин (KP), не являются предпочтительными, так как их трудно расщепить путем гидролиза. Предпочтительная длина пептида составляет от 6 до 20 аминокислот, чтобы свести к минимуму количество состояний заряда ионизации, добиться эффективной фрагментации MS/MS и высокой чувствительности, а также получить желаемое хроматографическое удерживание. Также предпочтительно избегать пептидных последовательностей, содержащих сайты гликозилирования. (S. T. Wu, Z. Ouyang, T. V. Olah, and M. Jemal, A strategy for liquid chromatography/tandem mass spectrometry based quantitation of pegylated protein drugs in plasma using plasma protein precipitation with water-miscible organic solvents and subsequent trypsin digestion to generate surrogate peptides for detection, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 25, no. 2, pp. 281-290, 2011)

Для идентификации уникальных суррогатных пептидов для каждого изотипа антител проводили выравнивание аминокислотных последовательностей подклассов IgG. Данные последовательности подвергали прогнозированию на основе расщепления трипсином *in silico* для идентификации уникальных пептидов.

Раствор иммуноглобулина подвергали ферментативному расщеплению, а полученные триптические пептиды анализировали и подвергали скринингу с помощью ЖХ-МС с использованием способа информационно-зависимого анализа (IDA). Установка IDA состояла из обзорного сканирования MPP для образования триптических пептидов

на основе предсказания *in silico* с последующим расширенным сканированием ионных продуктов для подтверждения идентичности пептида. Разделение пептидов достигается хроматографическими способами. Далее оценивали триптические пептиды с хорошей чувствительностью ЖХ-МС. Специфические пептиды идентифицировали путем интерпретации *in silico* триптических пептидов каждого изотипа антител. 1-3 наиболее чувствительных пептида для каждого изотипа ADA были выбраны в качестве уникальных пептидов-кандидатов и использованы для дальнейшей разработки способа. После активации соударений в МС/МС несколько заряженных ионов-предшественников фрагментировались на однозарядные b-ионы и y-ионы, и отбирались наиболее чувствительные y-ионы.

Для суррогатных пептидов были выбраны специфические ионные продукты. На Фиг. 1 представлен отбор ионных продуктов из суррогатного пептида IgG1 обезьяны. На Фиг. 2 и в Таблице 2 представлен выбор двух лучших переходов из суррогатного пептида IgG1 обезьяны и оптимизации энергии соударений. На Фиг. 2А представлена площадь пика ионных продуктов. На Фиг. 2В представлена выбранная энергия соударений.

Таблица 2. Два лучших перехода суррогатного пептида IgG1 Обезьяны с ионным продуктом и энергией соударений

Изотип	Пептид	Предшественник	Ионный Продукт	Название Иона	Энергия Соударений
IgG1 Обезьяны	GPSVFPLA	607,8300	727,4097	y7	16,8
	PSSR	607,8300	874,4781	y8	16,8

Для антитела человека аминокислотная последовательность уникального суррогатного пептида для идентификации изотипа антитела представляет собой GPSVFPLAPSSK для IgG1, GLPAPIEK для IgG2, WYVDGVEVHNAK для IgG3, GLPSSIEK для IgG4, DASGVTFTWTPSSGK для IgA1, DASGATFTWTPSSGK для IgA2, VSVFVPPR для IgM или DFTPPTVK для IgE. Для антитела обезьяны аминокислотная последовательность уникального суррогатного пептида для идентификации изотипа антитела представляет собой GPSVFPLAPSSR для IgG1, GPSVFPLASCSR для IgG2, GPSVFPLVSCSR для IgG3, GPSVFPLASSSR для IgG4, QIEVSWLR для IgM или DPSGATFTWTPSSGK для IgA.

Пример 2. Разработка способа ЖХ-ММР-МС для идентификации и количественного определения изотипов ADA.

Разработан способ ММР (мониторинга множественных реакций), основанный на ЖХ-МС, например способ ЖХ-ММР-МС, для изотипирования и количественного определения ADA, включая выбор уникальных суррогатных пептидов для каждого изотипа или подкласса антител обезьяны или человека, разработку способа ММР на тройном квадрупольном масс-спектрометре и определение предела чувствительности прибора.

Способы ЖХ-ММР-МС были успешно разработаны для идентификации и

количественного определения изотипов ADA человека или обезьяны. После скрининга пептидов с помощью ЖХ-МС отбирали количественные и подтверждающие пептиды для количественного анализа MMP. Количественный пептид был выбран для количественного определения каждого интактного ADA. Другой пептид из другого места того же ADA, например, подтверждающий пептид был выбран для подтверждения точности данных количественного пептида и целостности первичной структуры белка в образцах. Полученные данные, основанные на количественном пептиде, были предоставлены для количественного определения изотипа ADA. Полученные данные, основанные на подтверждающем пептиде, использовали для оценки соответствия данных между количественными и подтверждающими пептидами. Ионный переход MMP для каждого пептида определяли на основе спектров ионных продуктов, в которых был выбран наиболее заметный ионный продукт. Параметры МС (скорость потока газа, температура, напряжение электрораспыления, потенциал декластеризации, энергия соударений и напряжение на выходе ячейки соударений) оптимизировали путем анализа триптических пептидов с различными значениями для каждого параметра МС. (Jiang et al., Innovative Use of LC-MS/MS for Simultaneous Quantitation of Neutralizing Antibody, Residual Drug, and Human Immunoglobulin G in Immunogenicity Assay Development, Analytic Chemistry, 2014, 86, p. 2673-2680).

Идентифицировали один количественный пептид и от одного до двух подтверждающих пептидов для каждого изотипа/подкласса антител. Было выбрано сорок переходов для ADA человека и тридцать переходов для ADA обезьяны. В Таблицах 3, 4 и 5 представлена оптимизация способа ЖХ-MMP-МС для изотипирования ADA обезьяны, включая аминокислотные последовательности уникальных суррогатных пептидов и подтверждающих пептидов для каждого изотипа антител, ион-предшественник, ионный продукт, энергию соударений и мониторинг во времени.

Таблица 3. Список уникальных пептидов для изотипирования ADA обезьяны для оптимизации способов ЖХ-MMP-МС.

Изотип	Уникальный Пептид (обезьяны)	Ион-предшественник	Ионный продукт	Энергия Соударений
IgG1	GPSVFPLAPSSR	607,8300	874,4781	16,8
			727,4097	
IgG2	GPSVFPLASCSR	639,3190	937,4560	23,8
			790,3876	
IgG3	GPSVFPLVSCSR	653,3346	965,4873	27,3
			818,4189	
IgG4	GPSVFPLASSSR	602,8197	864,4574	22,7
			717,3890	
IgM	QIEVSWLR	515,7876	789,4254	17,0

Изотип	Уникальный Пептид (обезьяны)	Ион-предшественник	Ионный продукт	Энергия Соударений
			561,3144	
IgA	DPSGATFTWTPSSGK	769,8597	863,4258	30,9
			475,2511	

Таблица 4. Список подтверждающих пептидов для изотипирования ADA обезьяны для оптимизации способов ЖХ-ММР-МС.

Изотип	Подтверждающий Пептид (обезьяны)	Ион-предшественник	Ионный продукт	Энергия Соударений
IgG1	ALPAPIQK	419,2633	653,3981	17,0
			485,3082	
IgG	STSESTAALGCLVK	475,2414	689,4015	12,3
			576,3174	
	VVSVLTVTHQDWLNG K	599,3282	617,3406	25,8
			318,1772	
	GLPAPIEK	412,7475	654,3821	13,8
			486,2922	
IgM	DWLSQSVFTCR	699,8272	984,4567	25,7
			583,2657	
	CTVTHTDLPSPLK	490,2537	541,3344	15,8
			147,1128	
IgA	GFSPEDVLVR	559,7957	827,4621	12,4
			414,2347	

Таблица 5. Мониторинг множественных реакций в разные моменты времени для изотипирования ADA обезьян.

Градиент	Время (мин)	% А	% В	Поток (мл/мин) Градиент
	0	95	5	0,4
	2	95	5	0,4
	10	75	25	0,4
	11	10	90	0,4
	12	10	90	0,4
	13	95	5	0,4
	15	95	5	0,4

В Таблицах 6 и 7 представлена оптимизация способа ЖХ-ММР-МС для

изотипирования ADA человека, включая аминокислотные последовательности уникальных суррогатных пептидов для каждого изотипа антител, ион-предшественник, ионный продукт, энергию соударений и мониторинг во времени.

Таблица 6. Список уникальных пептидов для изотипирования ADA человека для оптимизации способов ЖХ-MMP-МС.

Изотип	Уникальный Пептид (человека)	Ион-предшественник	Ионный продукт	Энергия Соударений
IgG1	GPSVFPLAPSSK	593,8270	699,4036	22,4
IgG2	GLPAPIEK	412,7475	654,3821	13,8
IgG3	WYVDGVEVHNAK	472,9017	697,3628	18,2
IgG4	GLPSSIEK	415,7345	660,3563	13,9
IgA1	DASGVFTFTWTPSSGK	770,8675	475,2511	27,9
IgA2	DASGATFTWTPSSGK	756,8519	863,4258	21,5
IgM	VSVFVPPR	450,7687	615,3613	15,0
IgE	DFTPPTVK	452,7424	541,3344	15,0

Таблица 7. Мониторинг множественных реакций в разные моменты времени для изотипирования ADA человека.

Градиент	Время (мин)	% А	% В	Поток (мл/мин) Градиент
	0	95	5	0,4
	2	95	5	0,4
	10	75	25	0,4
	11	10	90	0,4
	12	10	90	0,4
	13	95	5	0,4
	15	95	5	0,4

Пример 3. Определение предела чувствительности прибора

Предел чувствительности прибора определяли с использованием тройного квадрупольного ЖХ-МС, такого как тройной квадрупольный ЖХ-МС 6495C от Agilent Technologies. IgG, IgM или IgA обезьяны разводили в матрице БСА (бычьим сывороточном альбумине). Были исследованы различные количества пептидов иммуноглобулинов, включая 0,3 нг, 0,9 нг, 3 нг, 9 нг, 30 нг, 90 нг и 300 нг. На Фиг. 3 представлены результаты исследования для IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM и IgA обезьяны в

отношении линейности и предела чувствительности прибора. Способ ЖХ можно оптимизировать в течение 15 минут. Результаты подтверждающих пептидов хорошо согласовывались с соответствующими суррогатными пептидами, что свидетельствует о точном количественном определении с помощью способов ЖХ-MMP-МС и хорошей целостности первичных структур белка во время хранения и обработки образцов. Разработанные способы ЖХ-MMP-МС позволяют обнаруживать всего 0,3 нг количественных пептидов каждого изотипа ADA на тройном квадрупольном ЖХ-МС, таком как 6495C Triple Quadrupole LC/MS от Agilent Technologies.

Пример 4. Иммунозахват ADA с использованием лекарственных препаратов антител

Два типа способов иммунозахвата для выделения ADA из образцов сыворотки крови были разработаны с использованием лекарственных препаратов антител, при этом ADA могут специфически связываться с лекарственными препаратами антител. В первом способе лекарственные препараты антител были биотинилированы. Биотинилированные лекарственные препараты антител, которые были связаны с магнитными гранулами, покрытыми стрептавидином, использовали для захвата ADA в образцах сыворотки крови человека или обезьяны. Во втором способе лекарственные препараты антител сшивали непосредственно с магнитными гранулами с использованием реакции эпоксида с первичным амином через лизиновый остаток лекарственного препарата.

Гранулы с лекарственным препаратом, например гранулы с биотинилированным лекарственным препаратом или гранулы с сшитым лекарственным препаратом, использовали для захвата ADA из образцов сыворотки крови человека или обезьяны путем проведения этапа инкубации, при этом гранулы с лекарственным препаратом инкубировали с образцом сыворотки крови, содержащим ADA, в инкубационном буфере для захвата ADA. Затем магнитные гранулы выделяли с помощью магнита. Выделенные гранулы затем промывали промывочным раствором. После этого выделенные гранулы подвергали воздействию элюирующего раствора для выделения ADA из гранул с лекарственным препаратом.

ADA-Std, моноклональное антитело IgG1 обезьяны против легкой каппа-цепи человека, использовали в качестве положительного контроля ADA для оптимизации иммунозахвата ADA. ADA-Std разводили в сыворотке крови обезьян, чтобы имитировать образцы сыворотки, содержащие ADA. Однако для разработки способа МС, нацеленного на ADA, захваченные из образцов сыворотки крови обезьян, сыворотку крови мышей использовали для разбавления ADA-Std для уменьшения неспецифических взаимодействий.

Сравнивали степень извлечения ADA с использованием гранул с биотинилированными лекарственными препаратами и гранул с сшитыми лекарственными препаратами. Неожиданно оказалось, что использование гранул с сшитыми лекарственными препаратами для захвата ADA из образцов сыворотки крови дает высокие показатели степени извлечения около 83-98%. И напротив, использование гранул

с биотинилированными лекарственными препаратами для захвата ADA из образцов сыворотки крови может обеспечить степень извлечения только около 52-54%. В этих экспериментах ADA-Std, представленное в качестве исходных данных на Фиг. 4, использовали в качестве положительного контроля для сравнений. Как представлено на Фиг. 4, при использовании гранул с сшитым лекарственным препаратом А степень извлечения ADA составила 98%. При использовании гранул с сшитым лекарственным препаратом В степень извлечения ADA составила 83%. Однако при использовании гранул с биотинилированным лекарственным препаратом А степень извлечения ADA составила 52%. При использовании гранул с биотинилированным препаратом В степень извлечения ADA составила 54%. Таким образом, неожиданным преимуществом является то, что использование гранул с сшитым лекарственным препаратом для захвата ADA из образца сыворотки крови позволяет достичь высоких показателей степени извлечения ADA.

Пример 5. Оптимизация способа ферментативного расщепления

Способы ферментативного расщепления были оптимизированы для улучшения линейности и согласованности идентификации и количественного определения ADA. ADA, выделенные из образцов сыворотки крови путем использования способа иммунозахвата, подвергали высушиванию, такому как высушивание с помощью испарителя SpeedVac. Высушенные ADA растворяли в суспензионном растворе и затем подвергали ферментативному расщеплению, такому как расщепление трипсином, для количественного определения с использованием ЖХ-МС. Для оптимизации способа ферментативного расщепления использовали различные суспензионные растворы, включая использование денатурирующего раствора, такого как 8 М раствор мочевины.

Неожиданным преимуществом является то, что использование денатурирующего раствора для суспендирования выделенных ADA для ферментативного расщепления может значительно улучшить согласованность и линейность идентификации и количественного определения ADA, как представлено на Фиг. 5. Очищенное ADA-Std использовали в качестве положительного контроля в данных экспериментах. Высушенное ADA-Std растворяли в суспензионном растворе непосредственно перед ферментативным расщеплением без проведения этапа иммунозахвата. ADA-Std представлено как исходные данные на Фиг. 5. На Фиг. 5А представлено использование лекарственного препарата А для захвата ADA без использования денатурирующего раствора для растворения высушенных ADA. На Фиг. 5В представлено использование лекарственного препарата А или лекарственного препарата В для захвата ADA в присутствии денатурирующего раствора для растворения высушенных ADA. Как представлено на Фиг. 5В, когда для захвата ADA использовали лекарственный препарат А или лекарственный препарат В, количественная оценка захвата ADA продемонстрировала значительно улучшенную согласованность и линейность при наличии денатурирующего раствора для растворения высушенных ADA перед проведением ферментативного расщепления. Как представлено на Фиг. 5А, согласованность и линейность не наблюдались, когда денатурирующий раствор не использовался.

Пример 6. Наблюдение за неспецифическими взаимодействиями

Чтобы улучшить чувствительность и линейность иммунозахвата ADA для изотипирования и количественного определения с помощью ЖХ-МС, были разработаны исследования для наблюдения за неспецифическими взаимодействиями в сыворотке крови. ADA-Std, например, моноклональное антитело IgG1 обезьяны против легкой каппа-цепи человека, использовали в качестве положительного контроля ADA для разработки и оптимизации анализов иммунозахвата и ЖХ-МС для изотипирования и количественного определения ADA. ADA-Std разводили в сыворотке крови мыши или обезьяны для исследуемых диапазонов от 1,5 нг/мл до 10 мкг/мл при трехкратном разведении. ADA-Std разводили в сыворотке крови обезьян, чтобы имитировать образцы сыворотки, содержащие ADA. ADA-Std подвергали ферментативному расщеплению и анализам ЖХ-МС без прохождения этапов иммунозахвата.

Лекарственный препарат А или лекарственный препарат В использовали в способе иммунозахвата для выделения ADA из образцов сыворотки крови обезьян. Выделенные ADA разводили в сыворотке крови мыши или обезьяны и затем подвергали ферментативному расщеплению и анализам ЖХ-МС. Как представлено на Фиг. 6, добавление сыворотки крови обезьяны может вызвать неспецифические взаимодействия и сильный фоновый шум, что может привести к снижению согласованности и линейности количественного определения. Результаты исследования демонстрируют хорошую линейность в сыворотке крови мыши.

ADA-Std разводили в сыворотке крови обезьян, чтобы имитировать образцы сыворотки, содержащие ADA. Обнаружение сигналов IgG1 может представлять собой комбинацию сигнала ADA-Std и эндогенного IgG1 из сыворотки крови обезьяны. И напротив, любые другие обнаруженные изотипы антител могут представлять собой эндогенные антитела, образованные в результате неспецифического связывания с сывороткой крови обезьяны.

Пример 7. Оптимизация условий инкубации для иммунозахвата

Поскольку некоторые компоненты в сыворотке крови обезьян могут вызывать неспецифические взаимодействия, которые приводят к высоким фоновым шумам, способ иммунозахвата был дополнительно оптимизирован для повышения чувствительности и согласованности изотипирования и количественного определения ADA с использованием анализов ЖХ-МС. Лекарственный препарат, который использовали для захвата ADA, инкубировали с образцом сыворотки крови обезьяны, содержащим ADA, при различных условиях инкубации, включая инкубацию при комнатной температуре в течение 1 часа или при 4°C в течение ночи. К удивлению оказалось, что условия инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа обеспечивают значительное снижение фоновых шумов. Фоновые шумы были низкими с улучшенной согласованностью и линейностью, когда инкубация проводилась при комнатной температуре в течение 1 часа, поэтому это усиливало сигналы ADA в анализах ЖХ-МС.

Как представлено на Фиг. 7А, когда лекарственный препарат В или лекарственный

препарат С инкубировали с образцами сыворотки крови обезьяны при 4 °С в течение ночи, количественному определению ADA-IgG1 не хватало линейности и согласованности. Как представлено на Фиг. 7А, когда лекарственный препарат В или лекарственный препарат С инкубировали с образцами сыворотки крови обезьяны при комнатной температуре в течение 1 часа, количественному определению ADA-IgG1 не хватало линейности и согласованности. ADA-Std использовали в качестве положительного контроля в этих экспериментах и обозначали как исходные данные ADA на Фиг. 7. На Фиг. 8 представлена оптимизация условий инкубации для иммунозахвата с использованием IgG2 в качестве индикатора шума. Как представлено на Фиг. 8, для захвата ADA из образцов сыворотки крови обезьян использовали лекарственный препарат В или лекарственный препарат С, условия инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа обеспечивали меньше шума при изотипировании и количественном определении IgG2 по сравнению с условиями инкубации при 4°С в течение ночи.

Пример 8. Оптимизация иммунозахвата путем прерывания взаимодействия в сыворотке крови

Существуют различные специфические или неспецифические взаимодействия между компонентами сыворотки крови, такие как связывание между антигенами и антителами или агрегации белков. Чтобы уменьшить высокие фоновые шумы, способ иммунозахвата был дополнительно оптимизирован для уменьшения неспецифических или специфических взаимодействий в сыворотке. К удивлению оказалось, что добавление кислых растворов к образцам сыворотки крови перед проведением иммунозахвата может значительно уменьшить фоновые шумы при идентификации и изотипировании выделенных ADA с использованием анализов ЖХ-МС.

Обычно диапазон pH образца сыворотки крови составляет pH около 8,0. К образцу сыворотки крови добавляли кислый раствор, такой как 300 mM уксусная кислота, для достижения кислого диапазона pH для осуществления кислотной диссоциации между компонентами сыворотки крови, такого как pH около 3,6. pH кислого образца сыворотки крови впоследствии доводили до pH около 4,5 для реализации иммунозахвата с использованием гранул с лекарственным препаратом, например, корректировка pH путем добавления буфера HBST, например, 10 mM HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфокислота), 150 mM хлорида натрия, 3 mM ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) и 0,2% Твин-20 (полисорбат 20) при pH 7,4.

Кислотная диссоциация образцов сыворотки крови дала неожиданные преимущества в виде значительного снижения фоновых шумов. Дальнейшую оптимизацию кислотной диссоциации проводили с использованием двух кислых условий 1 и 2. Способ с кислым условием 1 включает добавление 1 мкл 5 М уксусной кислоты к 49 мкл образца сыворотки крови обезьяны для достижения конечной концентрации уксусной кислоты 300 mM и инкубацию в течение 1 часа. Способ с кислым условием 2 включает добавление 50 мкл 600 М уксусной кислоты к 50 мкл образца сыворотки крови обезьяны для достижения конечной концентрации уксусной кислоты 300 mM и инкубацию в

течение 1 часа.

Как представлено на Фиг. 9, для захвата ADA использовали лекарственный препарат А или лекарственный препарат В. Кислые условия 2 обеспечили значительное снижение фонового шума при изотипировании и количественном определении ADA в отношении IgG2, IgG3 и IgA по сравнению с кислыми условиями 1. Кислые условия 2 являются предпочтительными условиями для проведения кислотной диссоциации для иммунозахвата изотипов IgG2, IgG3 и IgA ADA с использованием лекарственного препарата А или В. Однако кислые условия 1 и 2 не обеспечивают значительного снижения фоновых шумов при изотипировании и количественном определении IgG4. Это указывало на необходимость дальнейшей оптимизации для снижения высокого фонового шума при изотипировании и идентификации IgG4. Это также указывает на то, что неспецифические взаимодействия в сыворотке крови не вносят значительного вклада в высокие фоновые шумы при изотипировании и количественном определении IgG4.

Пример 9. Иммунозахват с использованием Fab-области лекарственного препарата IgG

9.1. Изотипирование и количественное определение изотипа IgG4 ADA. Лекарственный препарат антитела, который содержал только Fab-область IgG, использовали для захвата ADA для исследования неспецифических взаимодействий в сыворотке крови с целью оптимизации способа иммунозахвата. Как указано в Таблице 1, лекарственные препараты А-Е содержат полноразмерные молекулы IgG, а лекарственные препараты F-J содержат только Fab-области молекул IgG. Как представлено на Фиг. 10, лекарственный препарат с только Fab-областью устраняет взаимодействия сывороточного IgG4 с Fc-областью лекарственных препаратов IgG4. Для IgG1 как полноразмерное антитело, так и только Fab-область имеют низкое неспецифическое связывание. Использование Fab-областей лекарственных препаратов IgG для захвата ADA значительно уменьшило фоновые шумы при изотипировании и идентификации IgG4 ADA. В частности, когда лекарственный препарат F, лекарственный препарат G и лекарственный препарат H использовались для иммунозахвата ADA для изотипирования и количественного определения ADA IgG4, фоновые шумы были значительно снижены по сравнению с тем, когда использовались лекарственный препарат А, лекарственный препарат В и лекарственный препарат С.

Лекарственный препарат А, лекарственный препарат В и лекарственный препарат С содержат полноразмерные молекулы IgG4. Лекарственный препарат F, лекарственный препарат G и лекарственный препарат H содержат только Fab-области IgG4. Результаты исследования демонстрируют, что эндогенные антитела IgG4 в образце сыворотки крови обезьяны могут играть значительную роль в формировании высоких фоновых шумов. Вполне вероятно, что эндогенные антитела IgG4 в образце сыворотки крови обезьяны могут взаимодействовать с Fc-областями лекарственного препарата А, лекарственного препарата В и лекарственного препарата С, поскольку данные лекарственные препараты содержат полноразмерные молекулы IgG4. Вполне вероятно, что эндогенные антитела IgG4 в

образце сыворотки крови обезьян могут взаимодействовать с Fc-областями лекарственных препаратов IgG4, такими как остаток L445 в IgG4. Следовательно, при использовании лекарственного препарата F, лекарственного препарата G и лекарственного препарата H фоновые шумы уменьшались или устранялись, поскольку эти препараты содержат только Fab-области IgG4 и не содержат Fc-областей. Вполне вероятно, что эндогенные антитела IgG4 в образце сыворотки крови обезьяны не взаимодействуют с Fc-областями лекарственного препарата IgG1 согласно результатам исследований на основе лекарственного препарата D и лекарственного препарата E.

9.2. Изотипирование и количественное определение изотипа IgM ADA.

Лекарственный препарат антитела, который содержал только Fab-область IgG, использовали для захвата ADA для исследования неспецифических взаимодействий в сыворотке крови с целью оптимизации способа иммунозахвата. Как указано в Таблице 1, лекарственные препараты A-E содержат полноразмерные молекулы IgG, а лекарственные препараты F-J содержат только Fab-области молекул IgG. Как представлено на Фиг. 11, использование Fab-областей лекарственных препаратов IgG для захвата ADA не приводило к значительному снижению фоновых шумов при изотипировании и идентификации ADA IgM. Результаты демонстрируют, что взаимодействие между сывороточным IgM и Fab-областью лекарственного препарата вызывает высокий фон IgM. В частности, когда лекарственный препарат F, лекарственный препарат G, лекарственный препарат H, лекарственный препарат I и лекарственный препарат J использовались для иммунозахвата ADA для изотипирования и количественного определения IgM, фоновые шумы были высокими по сравнению с тем, когда использовались лекарственный препарат A, лекарственный препарат B, лекарственный препарат C, лекарственный препарат D и лекарственный препарат E.

Лекарственный препарат A, лекарственный препарат B, лекарственный препарат C, лекарственный препарат D и лекарственный препарат E содержат полноразмерные молекулы IgG, например, IgG1 или IgG4. Лекарственный препарат F, лекарственный препарат G, лекарственный препарат H, лекарственный препарат I и лекарственный препарат J содержат только Fab-области молекул IgG. Результаты исследований демонстрируют, что эндогенные антитела IgM в образце сыворотки крови обезьяны могут играть значительную роль в формировании высоких фоновых шумов путем связывания с Fab-областями как лекарственного препарата IgG1, так и лекарственного препарата IgG4. Это указывало на необходимость дальнейшей оптимизации для снижения высоких фоновых шумов при изотипировании и идентификации IgM.

Пример 10. Определение нижнего предела количественного определения (НПКО)

10.1. Предпочтительные способы иммунозахвата и ферментативного расщепления.

Нижний предел количественного определения (НПКО) количественной оценки пептидов в соответствии с концентрацией ADA определяли с использованием

предпочтительных способов иммунозахвата и ферментативных способов. Предпочтительные способы иммунозахвата и ферментативного расщепления, которые использовались для построения калибровочных кривых для определения НПКО, включают обработку образца сыворотки крови, содержащего ADA, кислым раствором для кислотной диссоциации компонентов в сыворотке крови, последующую инкубацию образца сыворотки крови с лекарственным препаратом, который сшит непосредственно с гранулами для иммунозахвата ADA, выделение гранул, промывание изолированных гранул промывочным раствором, последующее выделение ADA из гранул с помощью элюирующего раствора и подвергание выделенных ADA ферментативному расщеплению для получения комбинации пептидов. Комбинацию пептидов подвергали анализу ЖХ-МС для изотипирования и количественного определения ADA. Предпочтительные способы иммунозахвата и ферментативные способы представлены на Фиг. 12 в качестве примера.

Например, кислотную диссоциацию проводили путем добавления 50 мкл 600 мМ уксусной кислоты к 50 мкл образца сыворотки крови и инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем гранулы с лекарственным препаратом инкубировали с образцами сыворотки крови при комнатной температуре в течение 1 часа. Например, 40 мкл 50 мкг/мл сшитого лекарственного препарата добавляли к образцу сыворотки крови, который разводили в 400 мкл 3% БСА (бычьего сывороточного альбумина) в буфере HBST. После этого гранулы выделяли. Выделенные гранулы промывали, по меньшей мере, одним промывочным раствором в количестве 0,5 мл, таким как буфер HBST и/или 3% БСА в буфере HBST. Затем ADA выделяли из гранул с помощью элюирующего раствора. Например, 200 мкл элюирующего раствора, например, 0,1% муравьиной кислоты/50% ацетонитрила, использовали для выделения ADA из гранул. Выделенные ADA высушивали, например, с помощью SpeedVac. Высушенные ADA суспендировали в денатурирующих растворах, таких как 8 М мочевины. Впоследствии выделенные ADA подвергали ферментативному расщеплению, такому как расщепление трипсином, и анализу ЖХ-МС для изотипирования и количественного определения ADA.

10.2. Построение калибровочной кривой.

Калибровочные кривые для обнаружения и количественного определения изотипов ADA были получены с использованием пептидов ADA, которые были получены с использованием предпочтительных способов иммунозахвата и ферментативного расщепления, как описано выше. ADA-Std использовали в качестве положительного контроля, который разводили в сыворотке крови обезьяны для обнаружения и количественного определения. Как представлено на Фиг. 13, диапазон исследования составлял от 1,5 нг/мл до 10 мкг/мл ADA при трехкратном разведении. Для иммунозахвата ADA использовали лекарственный препарат А или лекарственный препарат В. В образце НПКО наблюдался достаточный хроматографический отклик (отношение сигнал/шум), и при соответствующем времени удерживания пик интерференции не проявлялся. Предел чувствительности (ПЧ) был определен равным 40 нг/мл ADA, когда лекарственный препарат А или лекарственный препарат В использовали

для иммунозахвата ADA, как представлено на Фиг. 13. Предел квантификации (ПК) был определен равным 120 нг/мл ADA, когда лекарственный препарат А или лекарственный препарат В использовали для иммунозахвата ADA, как представлено на Фиг. 13. НПКО 120 нг/мл ADA был установлен для изотипирования и количественного определения ADA с использованием способов иммунозахвата и ЖХ-МС по данной заявке.

Пример 11. Определение предела переносимости лекарственного препарата.

При наличии терапевтические препараты в неклинических образцах сыворотки крови обезьян могут конкурировать с реагентами иммунозахвата за связывание с ADA, что также известно как лекарственная интерференция. Для оценки анализа переносимости к лекарственному препарату А и лекарственному препарату В, присутствующим в образцах сыворотки крови, образцы смешанной сыворотки обезьян, содержащие 500 нг/мл ADA-РС, исследовали при наличии различных концентраций лекарственного препарата А или лекарственного препарата В (в диапазоне от 0,38 нг/мл до 10 мкг/мл), чтобы определить, какие концентрации лекарственного препарата влияют как на количественный анализ ADA, так и на обнаружение ADA.

На количественный анализ ADA-РС не влиял лекарственный препарат А или лекарственный препарат В до тех пор, пока концентрация лекарственного препарата не достигала 195 нг/мл, как представлено на Фиг. 14. Когда концентрация лекарственного препарата превышала 195 нг/мл, концентрация ADA-РС, обнаруженная в анализе, начинала снижаться, что указывает на конкурирующее действие лекарственного препарата в сыворотке крови на связывание ADA.

Анализы связывания лиганда с ADA не являются количественными, а концентрации ADA в неклинических исследованиях сообщаются либо как отрицательные, либо как положительные со значением титра (разбавления), которое обеспечивает относительную количественную оценку ответа антител. В экспериментах по переносимости к лекарственным препаратам, ADA-РС все еще можно обнаружить даже при концентрации лекарственного препарата А или лекарственного препарата В 3,1 мкг/мл, при этом сигнал ADA-РС в 3 раза превышает фоновый уровень анализа при этой концентрации лекарственного препарата.

Пример 12. Изотипирование и количественное определение ADA в доклинических токсикологических исследованиях на обезьянах.

Способы иммунозахвата и ЖХ-МС по данной заявке использовали для изотипирования и количественного определения ADA в доклиническом токсикологическом исследовании лекарственного препарата В на обезьянах. Обезьян подвергали воздействию лекарственного препарата В еженедельно в дозе 1 мг/кг. Концентрации лекарственного препарата В в образцах сыворотки обезьян отслеживали в течение времени, чтобы получить доступ к токсикокинетике обезьян А, В и С, как представлено на Фиг. 15. Краткий обзор уровней лекарственного препарата, площади пика масс-спектрометрии всех изотипов ADA, преобразованных концентраций ADA и соотношения сигнал/шум для обезьяны А и обезьяны В представлены в Таблице 8.

Соотношение сигнал/шум представляет собой отношение площади пика данного образца к отрицательному образцу сыворотки обезьяны перед введением дозы. У обезьяны А наблюдалось быстрое снижение концентрации лекарственного препарата В в течение 60 дней. Концентрация препарата В в образцах сыворотки крови обезьяны В постепенно уменьшалась в течение 170 дней. Концентрации лекарственного препарата В в образцах сыворотки крови обезьяны С были стабильными без значительного снижения с течением времени.

Таблица 8. Краткий обзор уровней лекарственного препарата В, площади пика масс-спектрометрии всех изотипов ADA, преобразованных концентраций ADA и соотношения сигнал/шум.

Дни		0	43	57	71	85
Обезьяна А	Уровень лекарственного препарата (мкг/мл)	Ниже предела количественного определения	1,94	0,174	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения
	Площадь Пика	278	3309	10217	20911	28106
	Конц. ADA (мкг/мл)	0,03	0,34	1,06	2,17	2,92
	Сигнал/Шум	1,0	11,9	36,8	75,2	101,1
Обезьяна В	Уровень лекарственного препарата (мкг/мл)	Ниже предела количественного определения	20,6	24,6	23,4	20,2
	Площадь Пика	829	1231	2002	1160	1521
	Конц. ADA (мкг/мл)	0,08	0,13	0,21	0,12	0,16
	Сигнал/Шум	1,0	1,5	2,4	1,4	1,8
Дни		106	120	134	148	162
Обезьяна А	Уровень лекарственного препарата (мкг/мл)	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения	Ниже предела количественного определения
	Площадь Пика	33451	39392	42783	54189	55203

	Конц. ADA (мкг/мл)	3,48	4,10	4,45	5,64	5,75
	Сигнал/Шум	120,3	141,7	153,9	194,9	198,6
Обезьяна В	Уровень лекарственного препарата (мкг/мл)	10	4,79	0,828	0,396	0,124
	Площадь Пика	3425	3371	4443	5507	6986
	Конц. ADA (мкг/мл)	0,35	0,35	0,46	0,57	0,72
	Сигнал/Шум	4,1	4,1	5,4	6,6	8,4

Образцы сыворотки крови обезьян А, В и С подвергали изотипированию и количественному определению ADA лекарственного препарата В с использованием способов иммунозахвата и ЖХ-МС по данной заявке. Результаты исследования на ADA у обезьяны С были отрицательными, что указывало на отсутствие ADA у обезьяны С. Общее количество ADA у обезьян А и В измеряли с использованием способов иммунозахвата-ЖХ/МС по данной заявке, как представлено на Фиг. 16А. Общее количество ADA у обезьян А и В измеряли с использованием анализа связывания с лигандом (АСЛ), как представлено на Фиг. 16В.

Результаты исследований как способа иммунозахвата-ЖХ/МС, так и способа АСЛ были сопоставимы, демонстрируя сходные тенденции количества ADA с течением времени. Результаты исследований способов иммунозахвата-ЖХ/МС и АСЛ для обезьяны А были сопоставимы, демонстрируя сходные тенденции увеличения количества ADA с течением времени, как представлено на Фиг. 16А и 16В. Данные результаты исследований согласуются с быстрым снижением концентрации лекарственного препарата В в течение 60 дней у обезьяны А, как представлено в токсикокинетическом исследовании обезьяны А на Фиг. 15. Измерения общего количества ADA у обезьяны В с использованием АСЛ не позволили определить количество ADA с течением времени, как представлено на Фиг. 16В. Однако измерения общего количества ADA у обезьяны В с использованием способов иммунозахвата-ЖХ/МС позволили количественно оценить постепенное увеличение концентрации ADA в течение 170 дней, как представлено на Фиг. 16А, что согласуется с токсикокинетическим исследованием обезьяны В, как представлено на Фиг. 15.

Образцы сыворотки крови обезьян А и В подвергали изотипированию и количественному определению ADA с использованием способов иммунозахвата-ЖХ-МС по данной заявке. Данные способы позволили определить относительное количественное определение изотипов ADA, включая количества IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgA, как представлено на Фиг. 17А для обезьяны А и, как представлено на Фиг. 17В для обезьяны В.

Пример 13. Изотипирование и количественное определение ADA в доклинических фармакокинетических исследованиях на обезьянах.

Способы иммунозахвата и ЖХ-МС по данной заявке использовали для изотипирования и количественного определения ADA в доклиническом фармакокинетическом исследовании на обезьянах для лекарственного препарата А. Обезьян подвергали воздействию лекарственным препаратом А в однократной дозе для фармакокинетических исследований. Обезьяне А вводили 15 мг/кг лекарственного препарата А. Обезьяне В вводили 5 мг/кг лекарственного препарата А. Обезьяне С вводили 1 мг/кг лекарственного препарата А. Концентрации лекарственного препарата А в образцах сыворотки крови обезьян А, В и С отслеживали во времени, как представлено на Фиг. 18. Общее количество ADA у обезьян А, В и С измеряли с использованием способов иммунозахвата-ЖХ/МС по данной заявке, как представлено на Фиг. 19. Результаты исследования продемонстрировали, что уровень суммарных ADA в большей степени зависел от субъекта.

Образцы сыворотки крови обезьян А, В и С подвергали изотипированию и количественному определению ADA с использованием способов иммунозахвата-ЖХ-МС по данной заявке. Данные способы позволили определить относительное количественное определение изотипов ADA, включая количества IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и IgA, как представлено на Фиг. 20. Результаты исследований продемонстрировали, что ADA подтипа IgG1 способствовали повышенным уровням суммарных ADA у обезьяны В через 30 дней.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце, включающий:

контактирование образца с твердой подложкой, при этом, по меньшей мере, один фармацевтический препарат прикреплен к твердой подложке;

промывание твердой подложки с использованием, по меньшей мере, одного раствора подвижной фазы для получения, по меньшей мере, одного элюента;

выделение, по меньшей мере, одного пептида или белка из элюента;

обработку выделенного пептида или белка раствором для денатурации и/или реакцию ферментативного расщепления для получения компонентов выделенного пептида или белка;

идентификацию компонентов выделенного пептида или белка с помощью масс-спектрометра.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что определяют изотип или подкласс выделенного пептида или белка.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что выделенный пептид или белок количественно определяют с использованием масс-спектрометра.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фармацевтический препарат представляет собой лекарственный препарат, химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство или белковый фармацевтический препарат.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело, которое избирательно связывается с фармацевтическим препаратом, прикрепленным к твердой подложке.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело человека, при этом изотип антитела человека представляет собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM или IgE.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело млекопитающего, при этом изотип антитела млекопитающего представляет собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM или IgA.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело человека, и при этом аминокислотная последовательность компонента выделенного пептида или белка представляет собой GPSVFPLAPSSK, GLPAPIEK, WYVDGVEVHNAK, GLPSSIEK, DASGVTFTWTPSSGK, DASGATFTWTPSSGK, VSVFVPPR или DFTPPTVK.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело млекопитающего, при этом аминокислотная последовательность компонента выделенного пептида или белка представляет собой

GPSVFPLAPSSR, GPSVFPLASCSR, GPSVFPLVSCSR, GPSVFPLASSSR, QIEVSWLR или DPSGATFTWTPSSGK.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что перед контактированием с твердой подложкой образец обрабатывают раствором для достижения диапазона pH около 0,1-4,5.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что раствор содержит уксусную кислоту.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что образец инкубируют с твердой подложкой при комнатной температуре в течение около 1 часа.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что образец дополнительно содержит соль и поверхностно-активное вещество.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что образец дополнительно содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20).

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что образец имеет диапазон pH около 6-9.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что твердую подложку промывают с использованием, по меньшей мере, одного раствора подвижной фазы, который содержит соль и поверхностно-активное вещество, и, по меньшей мере, другого последующего раствора подвижной фазы, который имеет диапазон pH около 0,1-4,5.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что, по меньшей мере, один раствор подвижной фазы содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20) и имеет диапазон pH около 6-9.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что раствор для денатурации содержит около 5-10 М мочевины.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фермент реакции ферментативного расщепления представляет собой трипсин.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фармацевтический препарат прикрепляют к твердой подложке с помощью реакции эпоксида с первичным амином или с помощью взаимодействия биотин-стрептавидин.

21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фармацевтический препарат прикрепляют к твердой подложке с использованием остатка лизина фармацевтического препарата.

22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением или масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

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

24. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр способен выполнять анализы ЖК-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией) или ЖХ-ММР-МС

(жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций).

25. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой тройной квадрупольный масс-спектрометр.

26. Способ по п. 3, отличающийся тем, что компонент выделенного пептида или белка составляет, по меньшей мере, около 0,01 нг, по меньшей мере, около 0,1 нг, по меньшей мере, около 0,2 нг или, по меньшей мере, около 0,3 нг.

27. Способ по п. 3, отличающийся тем, что способ дополнительно включает следующие этапы:

проведение пептидного картирования выделенного пептида или белка,
выбор уникальных пептидов и фрагментных ионов выделенного пептида или белка для создания переходов ММР (мониторинга множественных реакций),
отбор двух или трех лучших переходов уникальных пептидов,
оптимизация энергии соударений уникальных пептидов,
последующее создание калибровочной кривой и
определение НПКО (нижнего предела количественного определения) в соответствии с калибровочной кривой.

28. Система для идентификации или количественного определения, по меньшей мере, одного пептида или белка в образце, включающая:

твердую подложку, при этом фармацевтический препарат прикреплен к твердой подложке;

по меньшей мере, один раствор подвижной фазы для промывки твердой подложки и способный обеспечить, по меньшей мере, один элюент, содержащий, по меньшей мере, один пептид или белок, для выделения, по меньшей мере, одного пептида или белка;

раствор для денатурации и/или раствор для ферментативного расщепления, способный генерировать компоненты из выделенного пептида или белка; и

масс-спектрометр, способный идентифицировать или количественно определять компоненты выделенного пептида или белка.

29. Система по п. 28, отличающаяся тем, что масс-спектрометр способен идентифицировать или количественно определять изотип или подкласс выделенного пептида или белка.

30. Система по п. 28, отличающаяся тем, что фармацевтический препарат представляет собой лекарственный препарат, химическое соединение, нуклеиновую кислоту, токсин, пептид, белок, слитый белок, антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство или белковый фармацевтический препарат.

31. Система по п. 28, отличающаяся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело, которое избирательно связывается с фармацевтическим препаратом, прикрепленным к твердой подложке.

32. Система по п. 28, отличающаяся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело человека, при этом изотип антитела человека представляет собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM или IgE.

33. Система по п. 28, отличающаяся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело млекопитающего, при этом изотип антитела млекопитающего представляет собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM или IgA.

34. Система по п. 28, отличающаяся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело человека, и при этом аминокислотная последовательность компонента выделенного пептида или белка представляет собой GPSVFPLAPSSK, GLPAPIEK, WYVDGVEVHNAK, GLPSSIEK, DASGVTFTWTPSSGK, DASGATFTWTPSSGK, VSVFVPPR или DFTPPTVK.

35. Система по п. 28, отличающаяся тем, что, по меньшей мере, один пептид или белок в образце представляет собой антитело млекопитающего, при этом аминокислотная последовательность компонента выделенного пептида или белка представляет собой GPSVFPLAPSSR, GPSVFPLASCSR, GPSVFPLVSCSR, GPSVFPLASSR, QIEVSWLR или DPSGATFTWTPSSGK.

36. Система по п. 28, отличающаяся тем, что перед контактированием с твердой подложкой образец обрабатывают раствором для достижения диапазона pH около 0,1-4,5.

37. Система по п. 36, отличающаяся тем, что раствор содержит уксусную кислоту.

38. Система по п. 28, отличающаяся тем, что образец инкубируют с твердой подложкой при комнатной температуре в течение около 1 часа.

39. Система по п. 28, отличающаяся тем, что образец дополнительно содержит соль и поверхностно-активное вещество.

40. Система по п. 28, отличающаяся тем, что образец дополнительно содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20).

41. Система по п. 40, отличающаяся тем, что образец имеет диапазон pH около 6-9.

42. Система по п. 28, отличающаяся тем, что твердую подложку промывают с использованием, по меньшей мере, одного раствора подвижной фазы, который содержит соль и поверхностно-активное вещество, и, по меньшей мере, другого последующего раствора подвижной фазы, который имеет диапазон pH около 0,1-4,5.

43. Система по п. 42, отличающаяся тем, что, по меньшей мере, один раствор подвижной фазы содержит БСА (бычий сывороточный альбумин), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту), хлорид натрия, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) и Твин-20 (полисорбат 20) и имеет диапазон pH около 6-9.

44. Система по п. 28, отличающаяся тем, что раствор для денатурации содержит около 5-10 М мочевины.

45. Система по п. 28, отличающаяся тем, что фермент ферментативного расщепления представляет собой трипсин.

46. Система по п. 28, отличающаяся тем, что фармацевтический препарат прикрепляют к твердой подложке с помощью реакции эпоксида с первичным амином или с помощью взаимодействия биотин-стрептавидин.

47. Система по п. 28, отличающаяся тем, что фармацевтический препарат прикрепляют к твердой подложке с использованием остатка лизина фармацевтического препарата.

48. Система по п. 28, отличающаяся тем, что масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением или масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

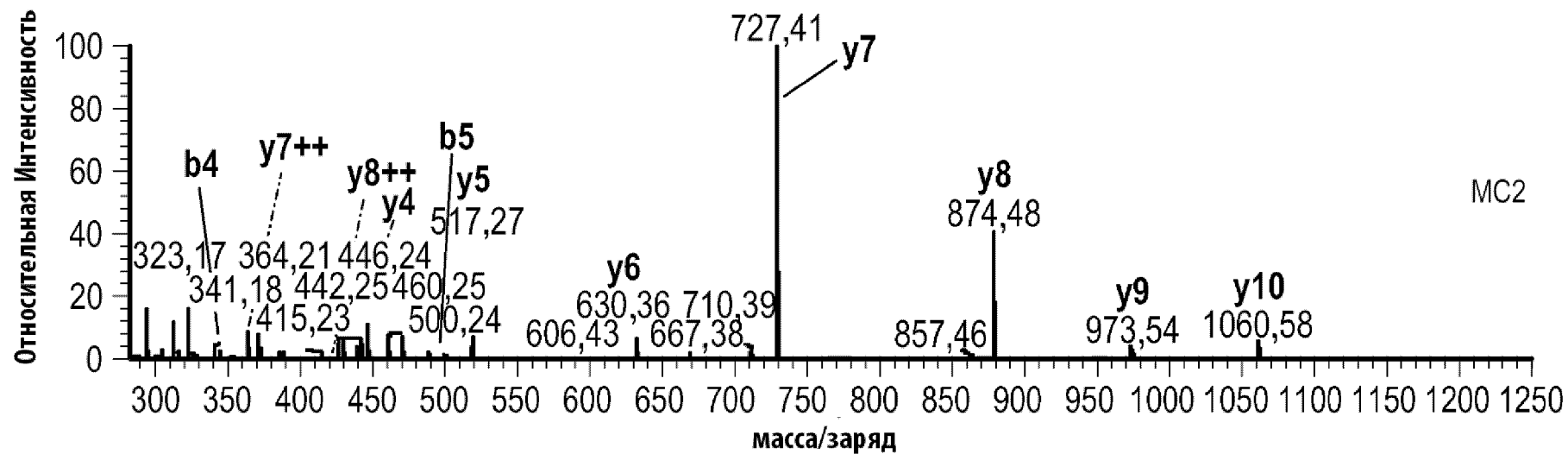
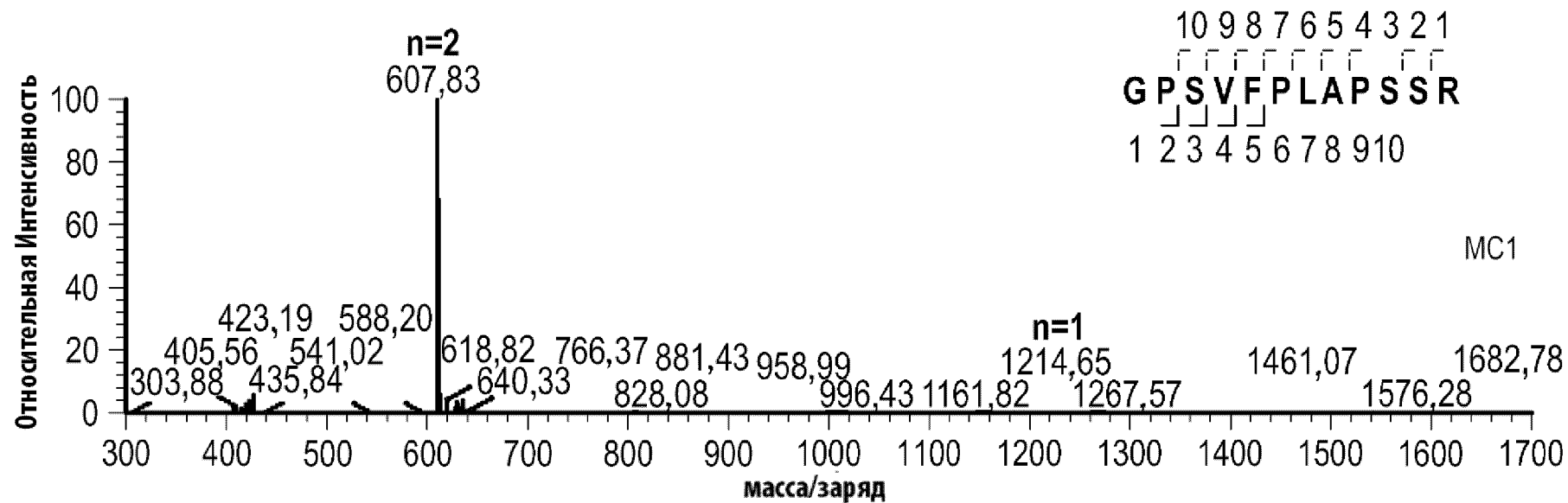
49. Система по п. 28, отличающаяся тем, что масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

50. Система по п. 28, отличающаяся тем, что масс-спектрометр способен выполнять анализы ЖК-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией) или ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций).

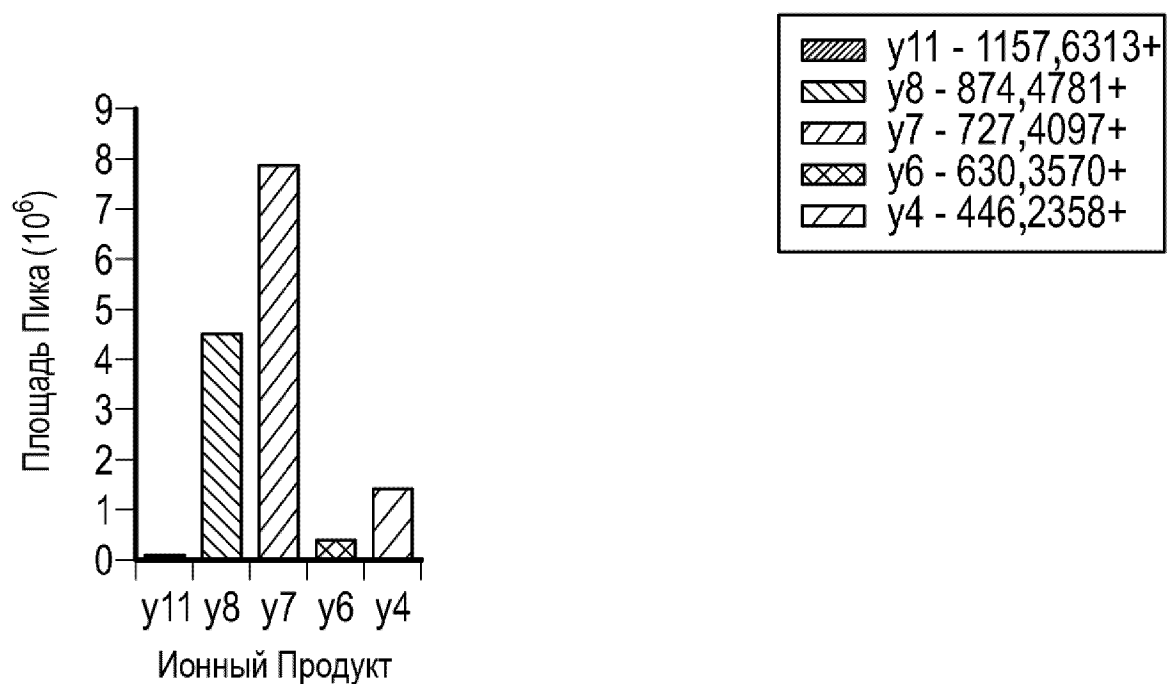
51. Система по п. 28, отличающаяся тем, что масс-спектрометр представляет собой тройной квадрупольный масс-спектрометр.

52. Система по п. 28, отличающаяся тем, что система предусматривает:
проведение пептидного картирования выделенного пептида или белка,
выбор уникальных пептидов и фрагментных ионов выделенного пептида или белка для создания переходов ММР (мониторинга множественных реакций),
отбор двух или трех лучших переходов уникальных пептидов,
оптимизация энергии соударений уникальных пептидов,
последующее создание калибровочной кривой и
определение НПКО (нижнего предела количественного определения) в соответствии с калибровочной кривой.

По доверенности



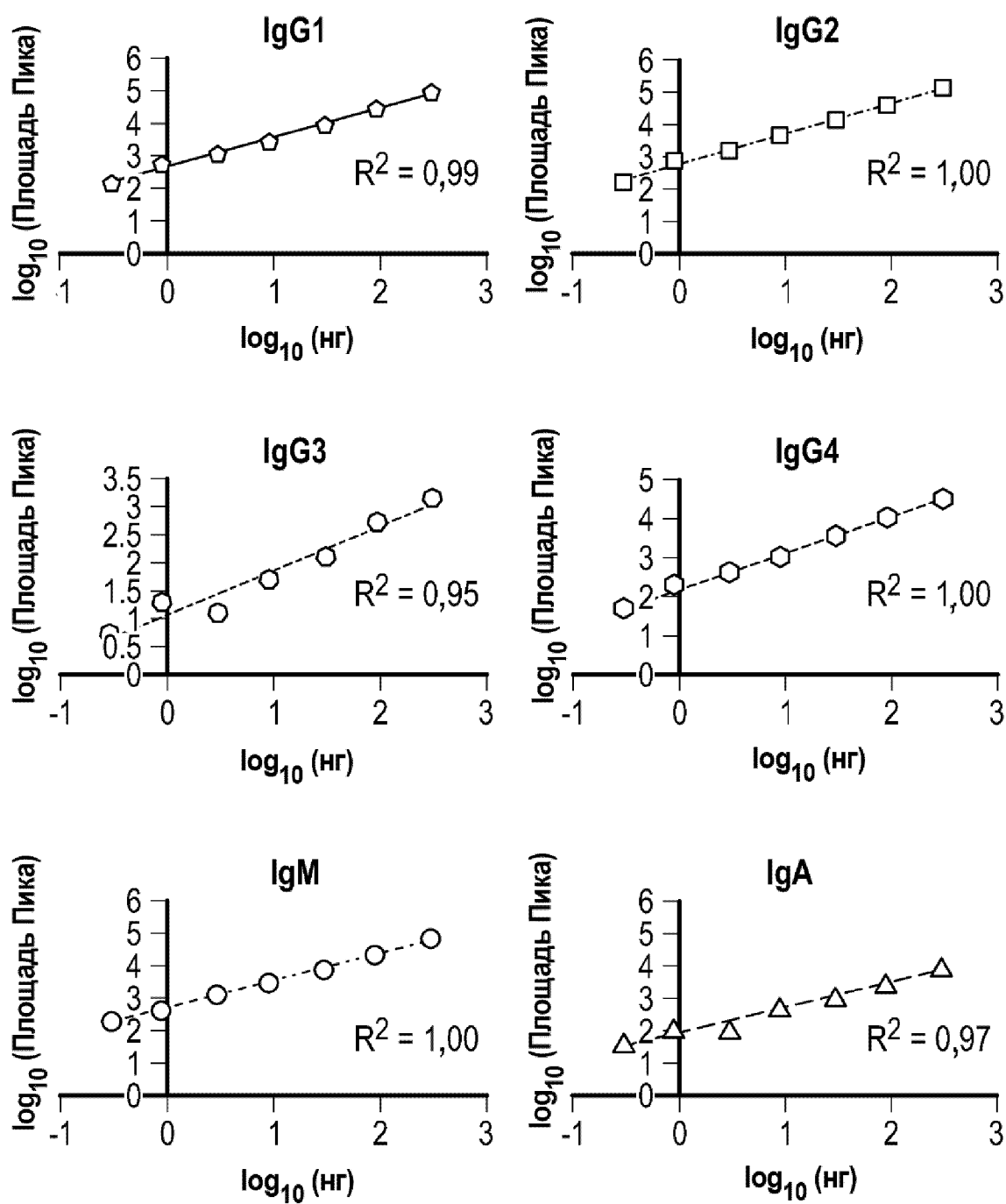
Фиг. 1



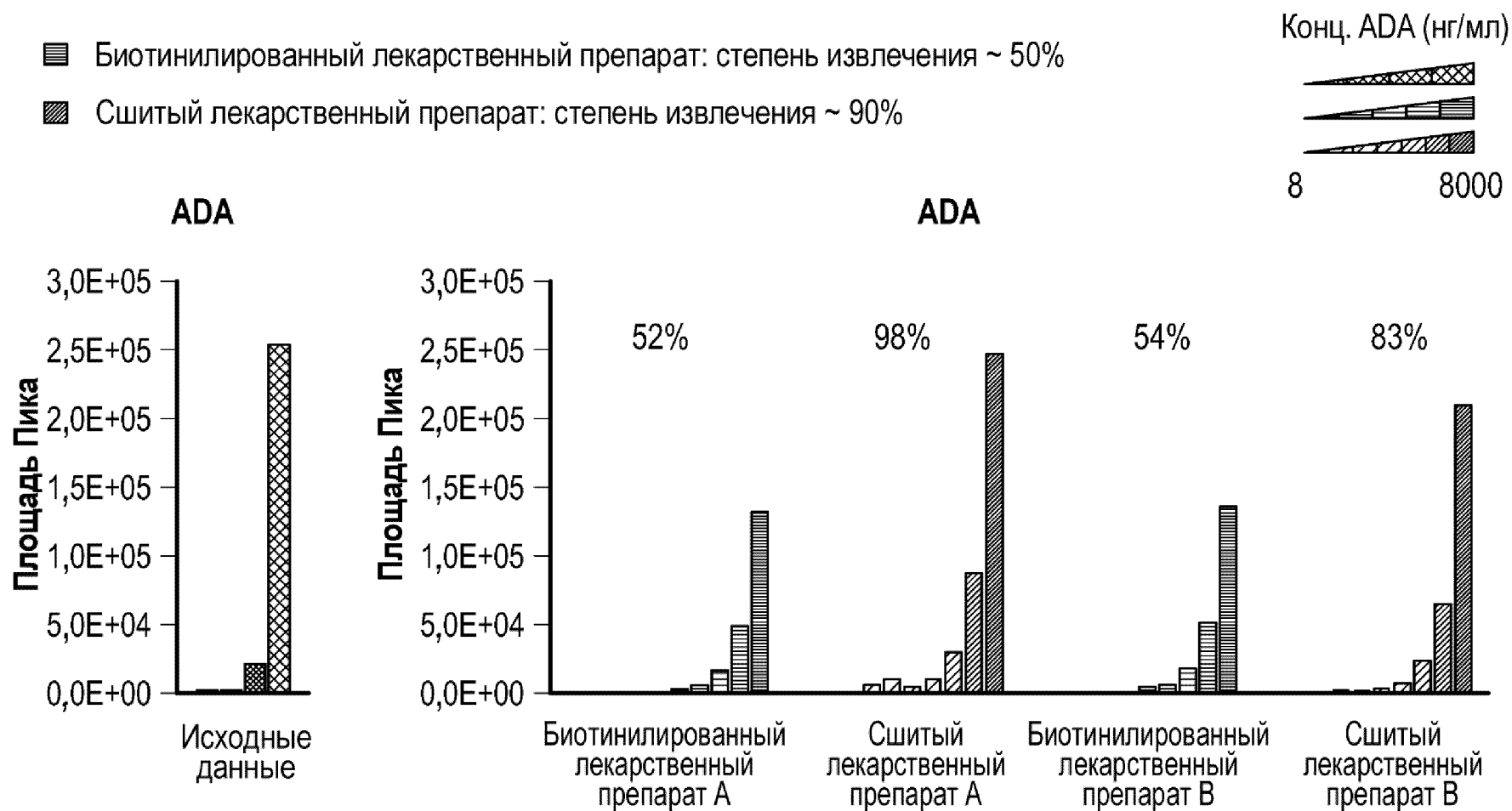
Фиг. 2А



Фиг. 2В

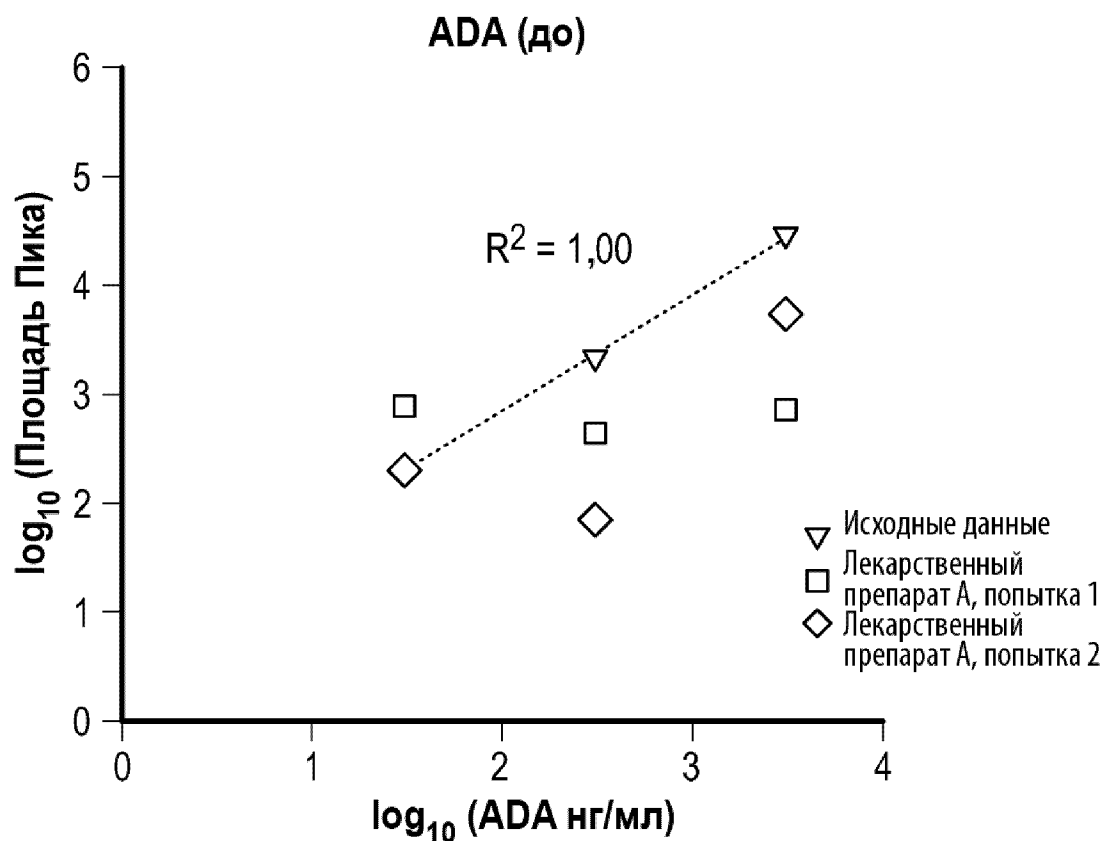


Фиг. 3

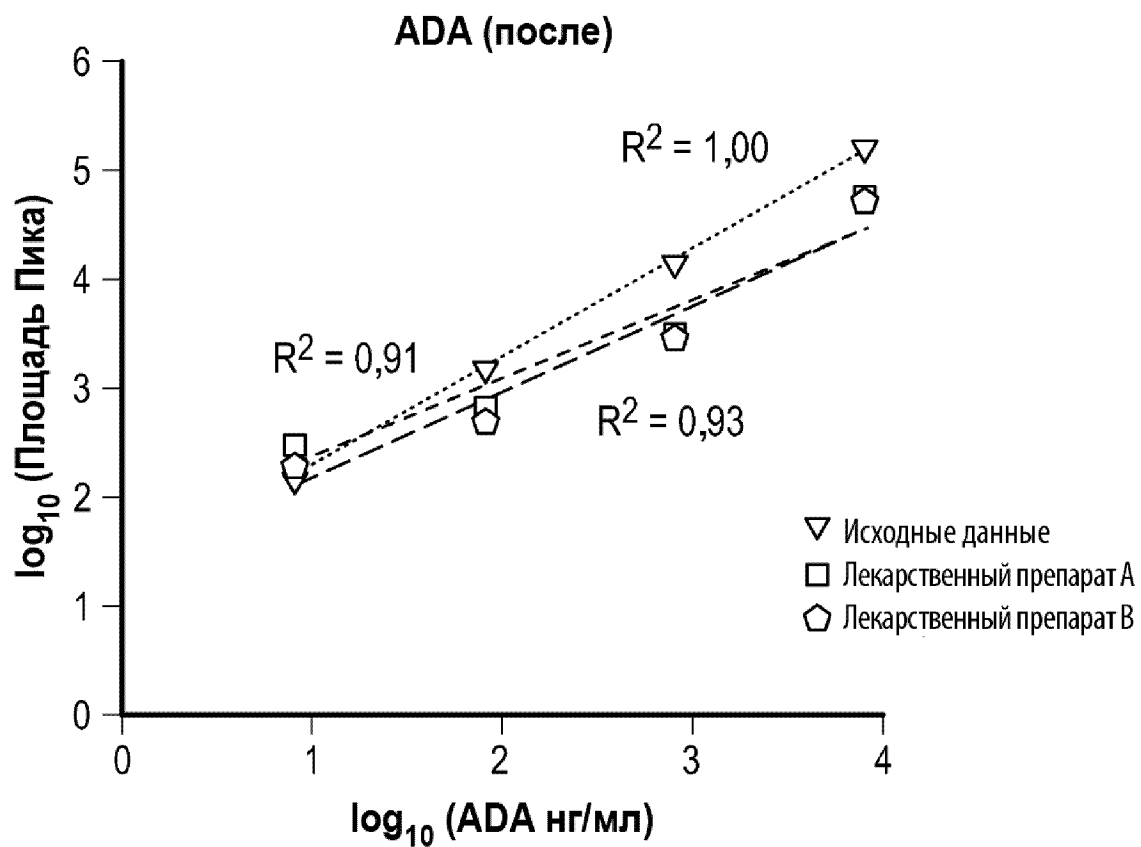


Фиг. 4

5/21



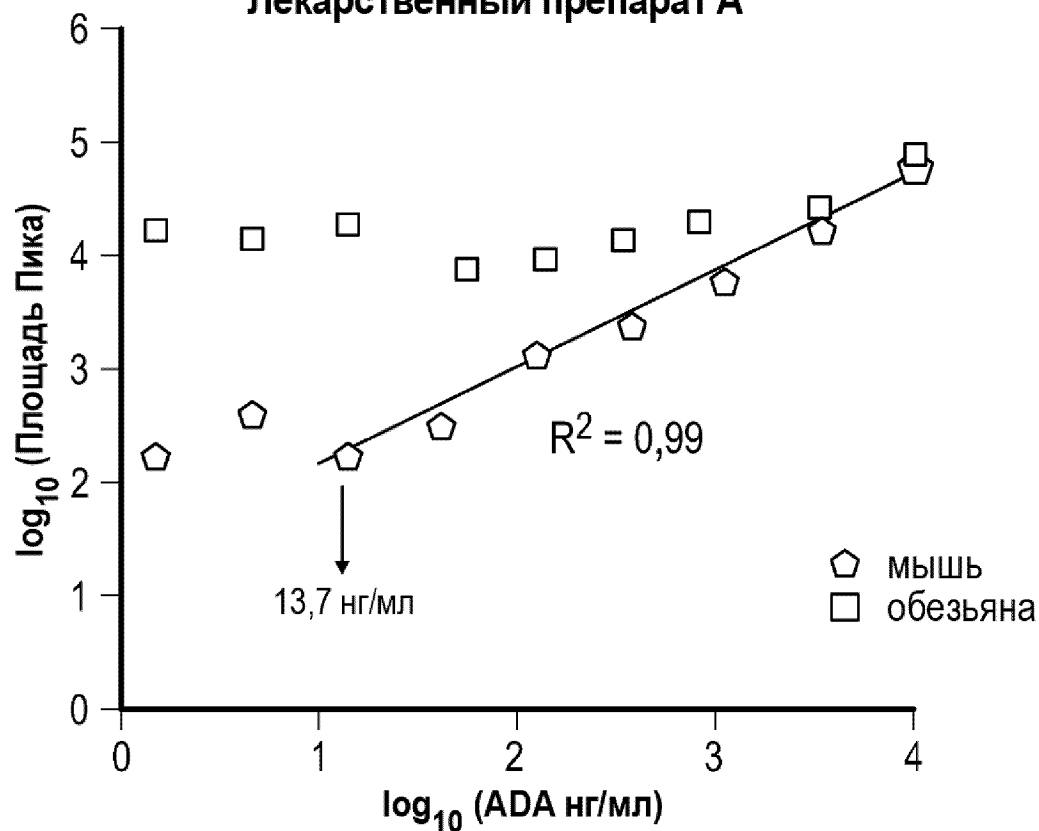
Фиг. 5А



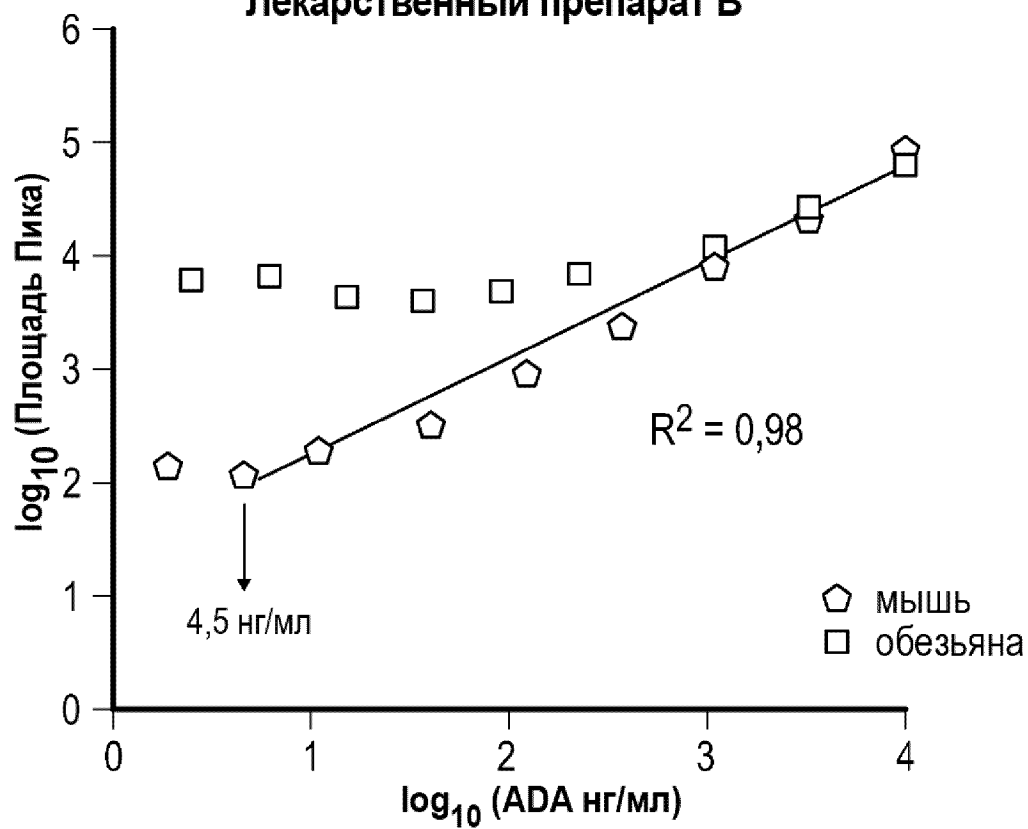
Фиг. 5В

6/21

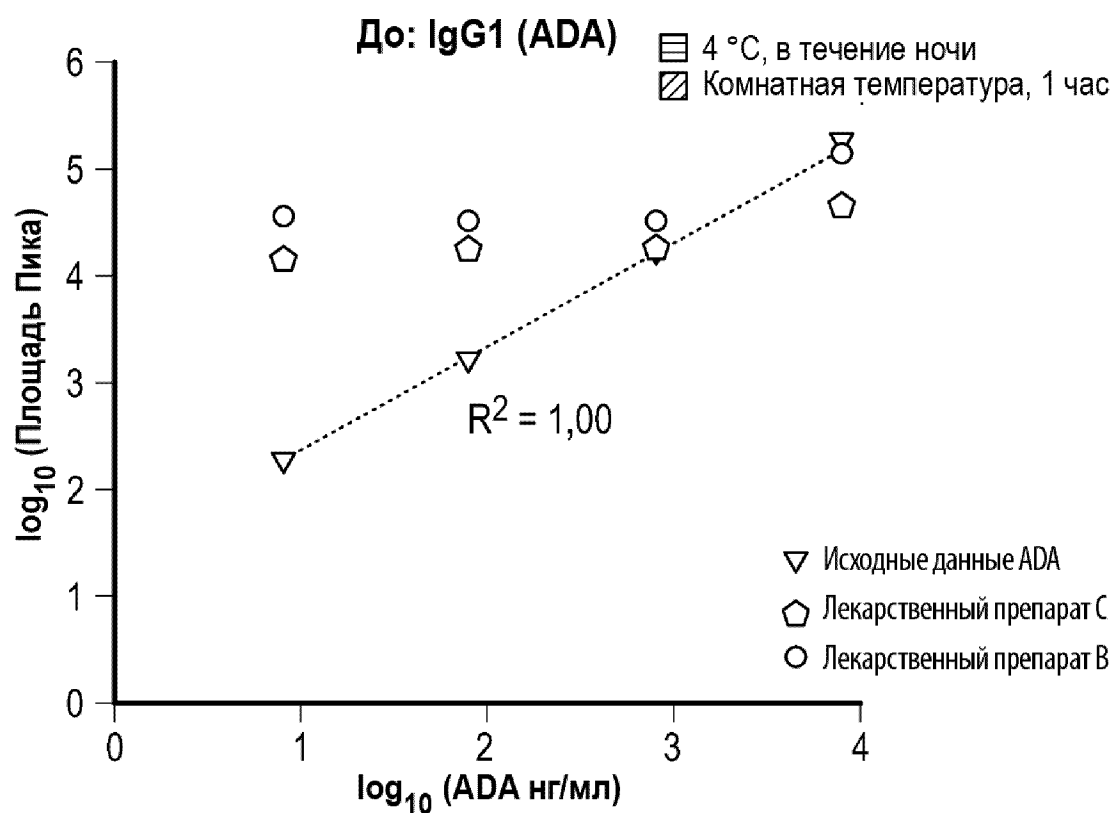
Лекарственный препарат А



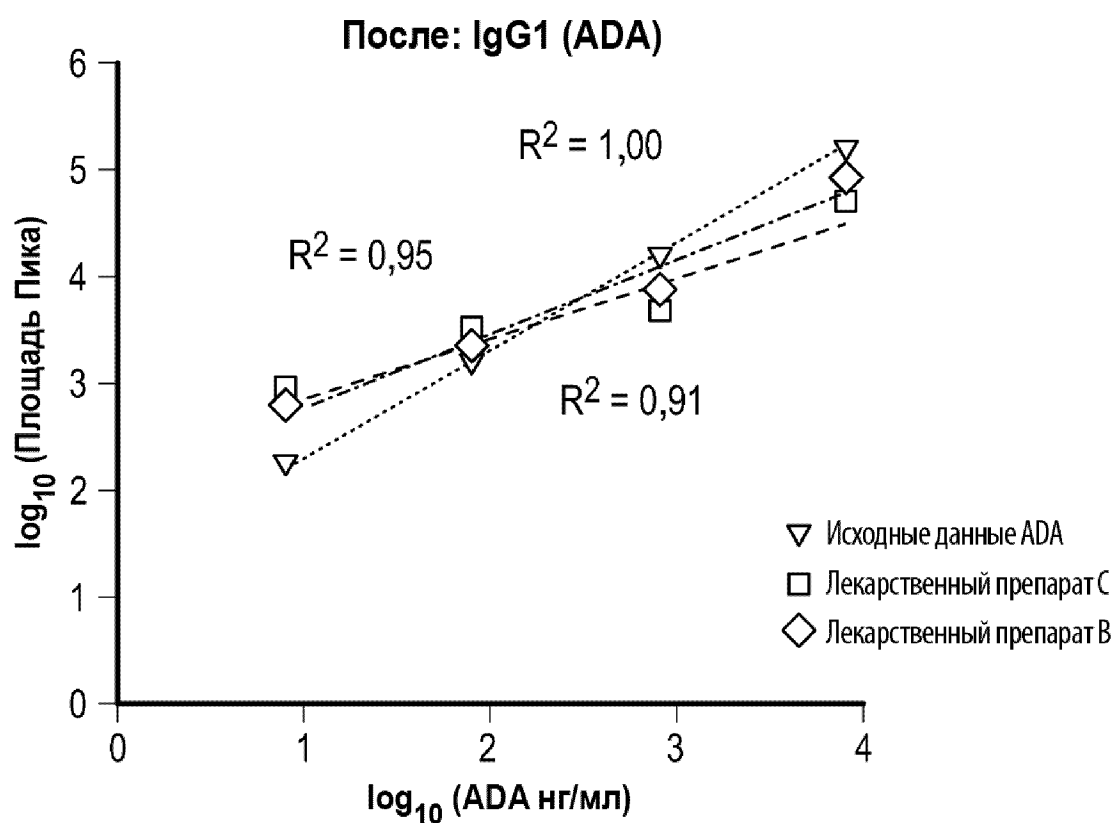
Лекарственный препарат В



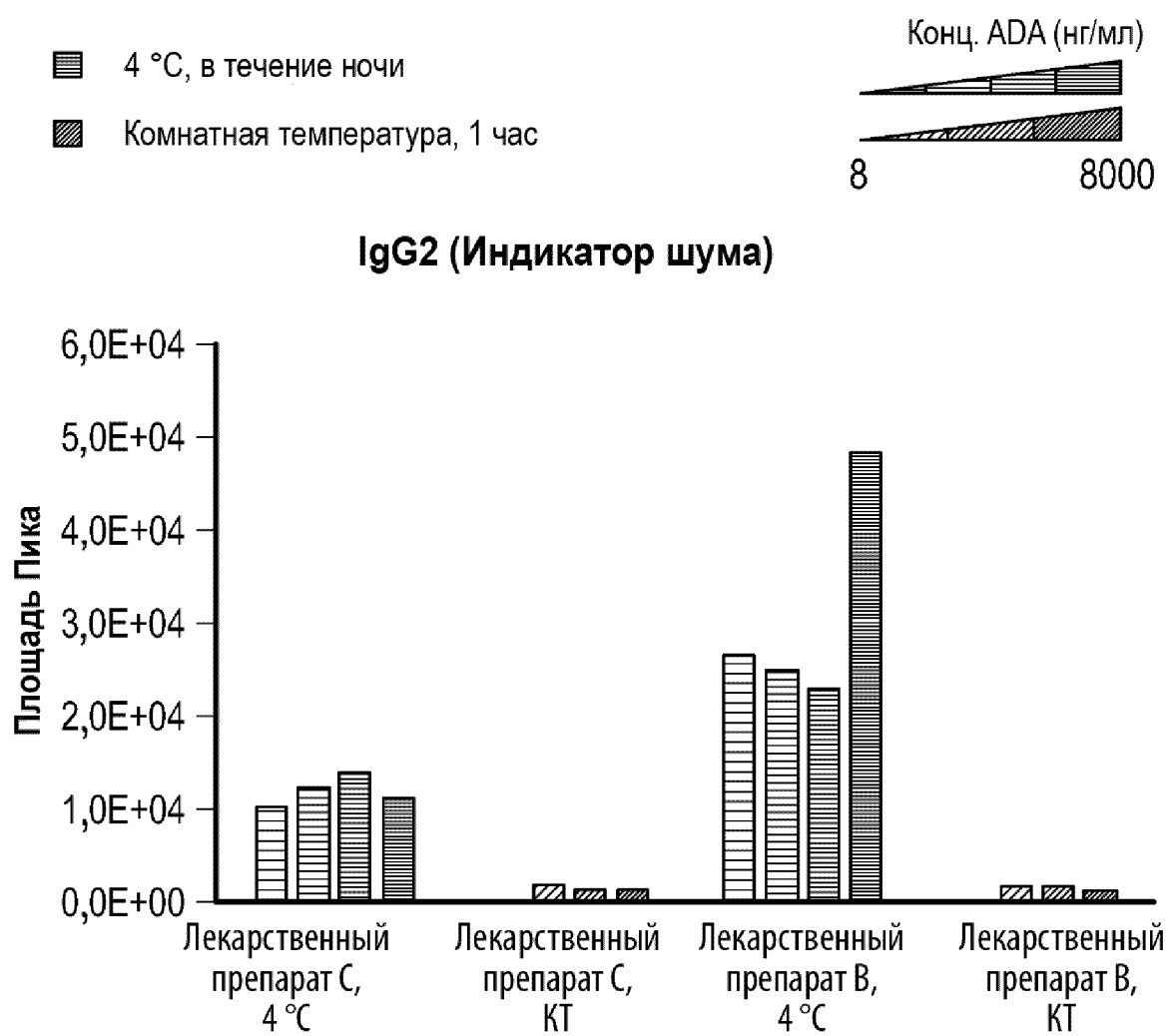
Фиг. 6



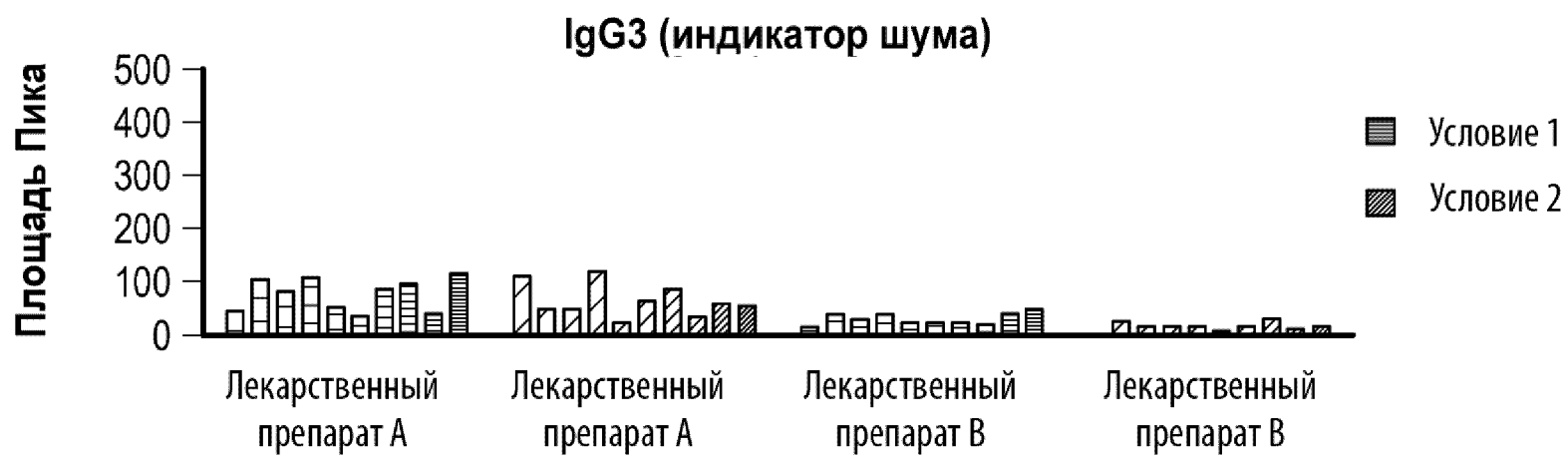
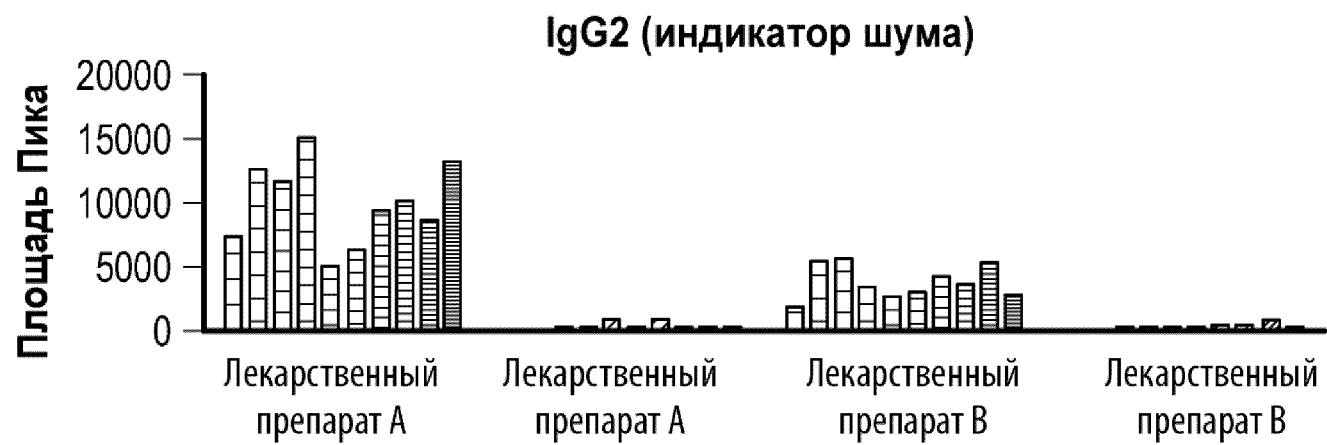
Фиг. 7А



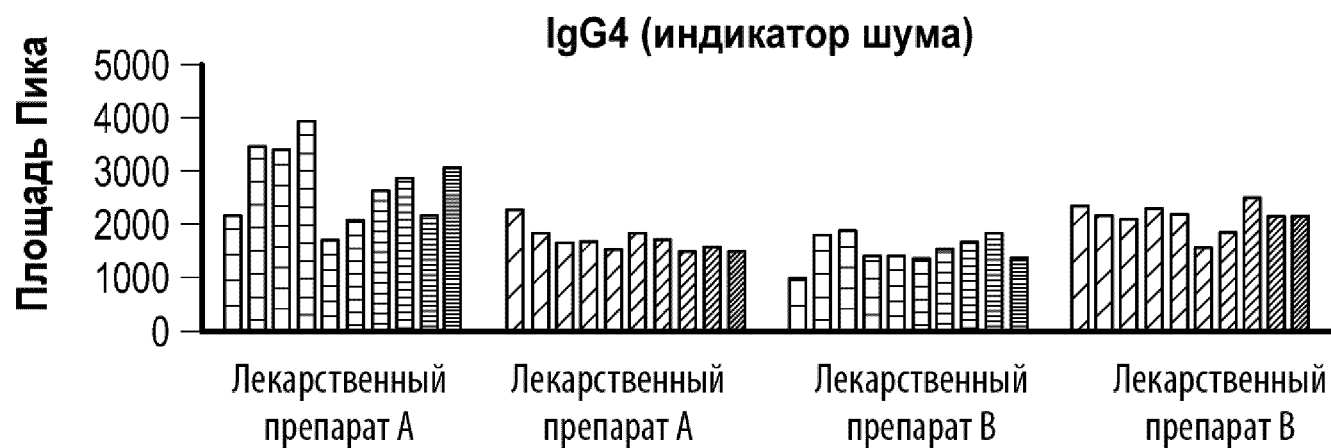
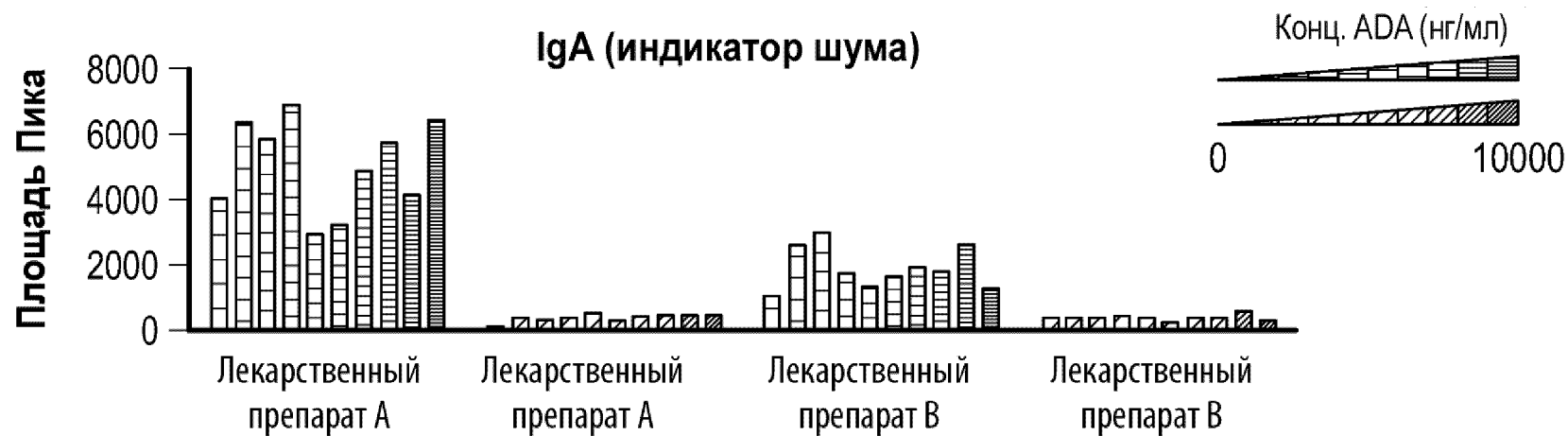
Фиг. 7В



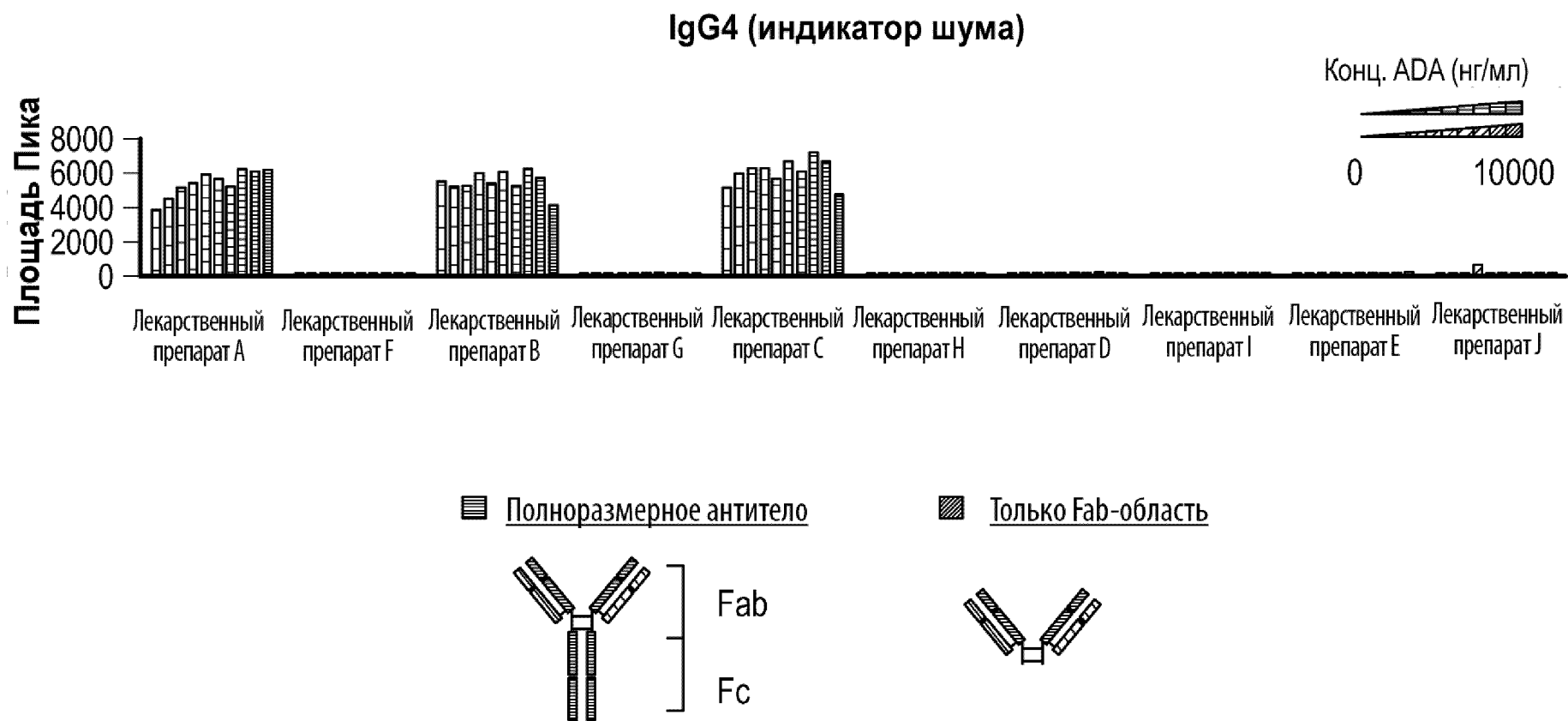
Фиг. 8



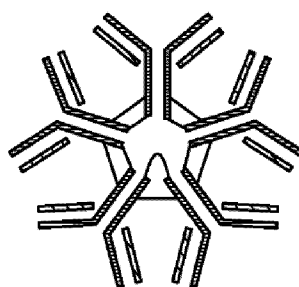
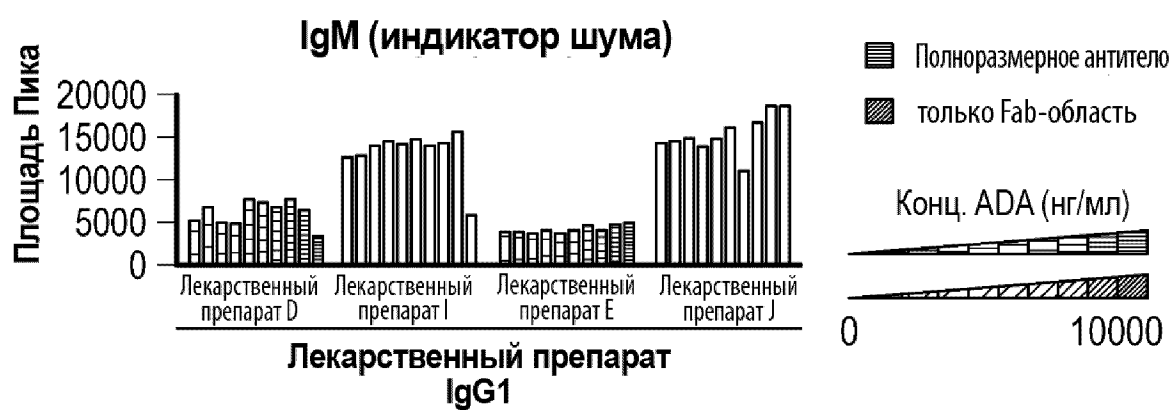
Фиг. 9



Фиг. 9 (продолж.)

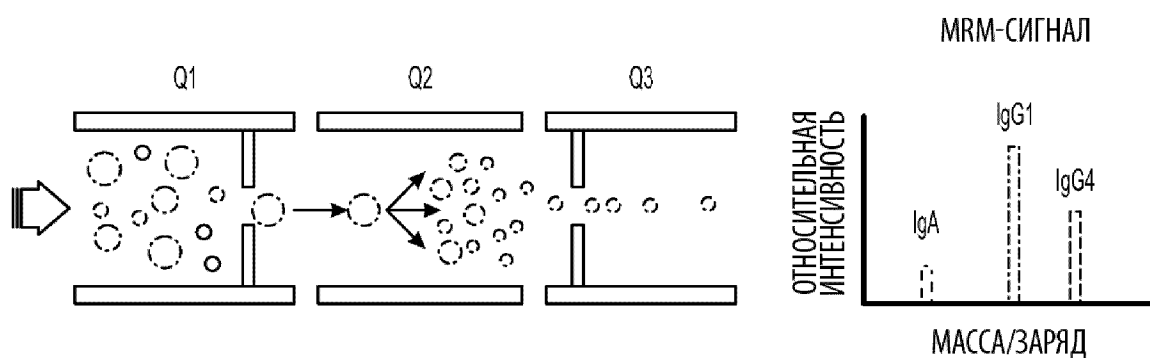
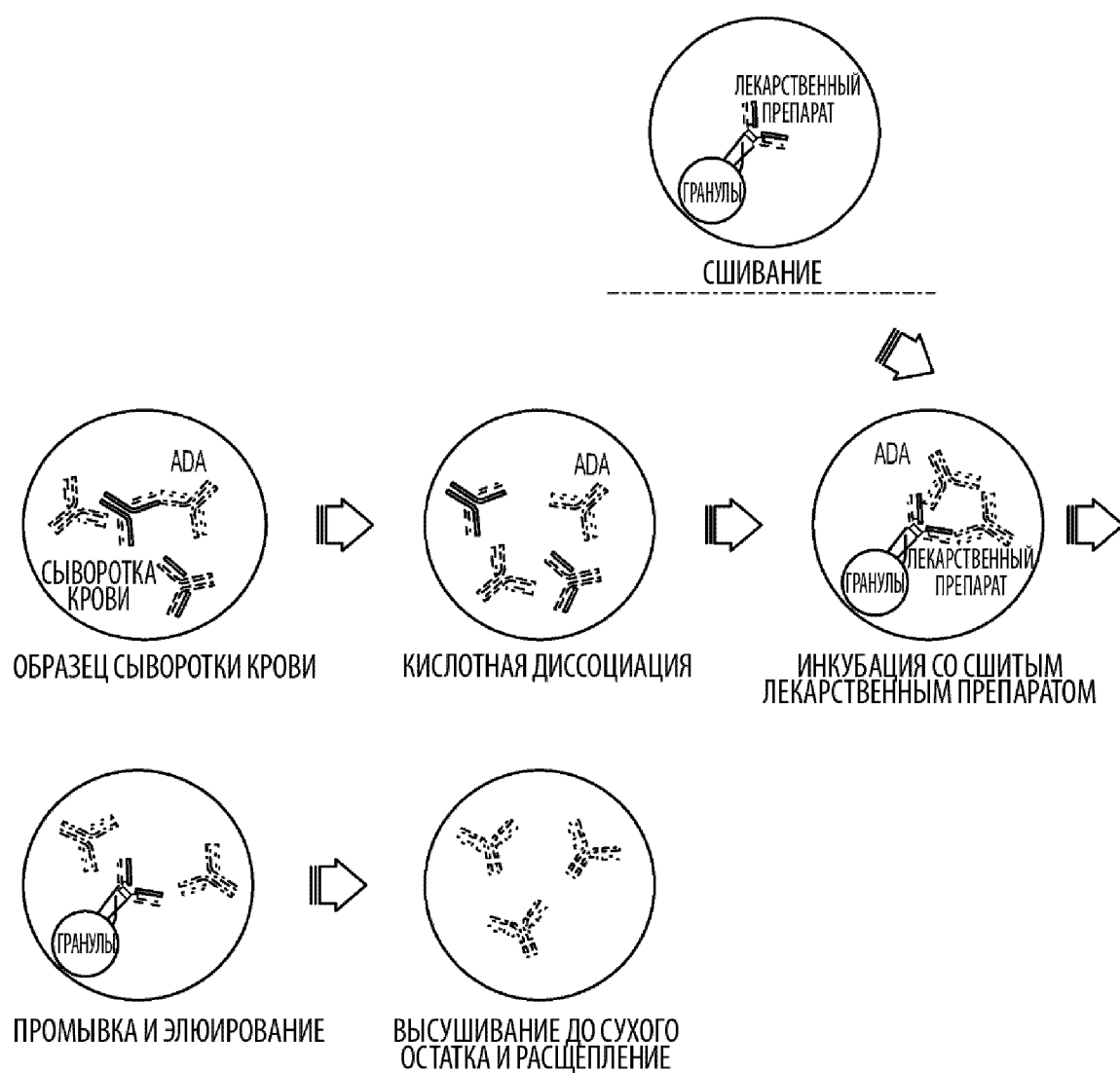


Фиг. 10

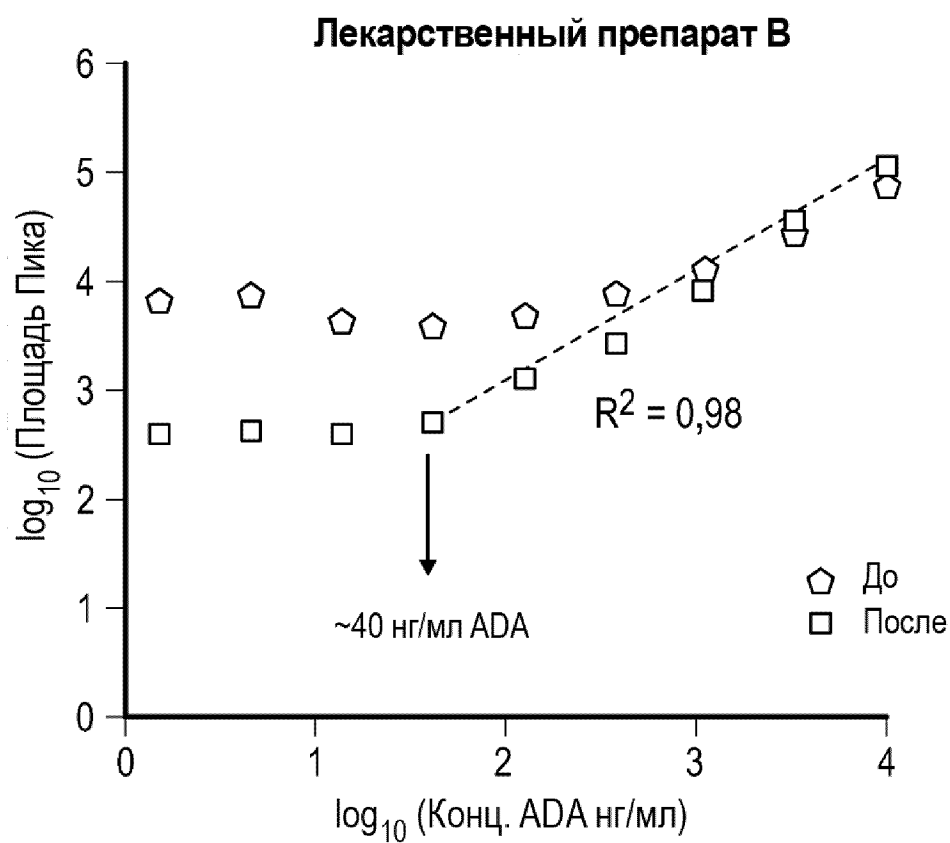
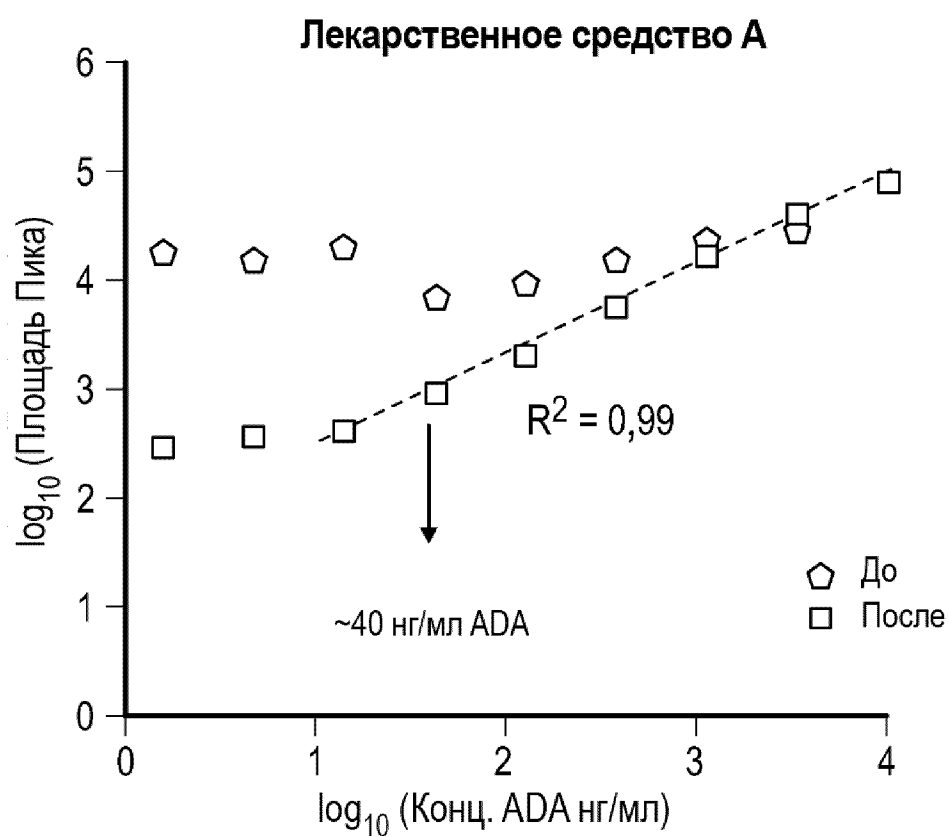


IgM

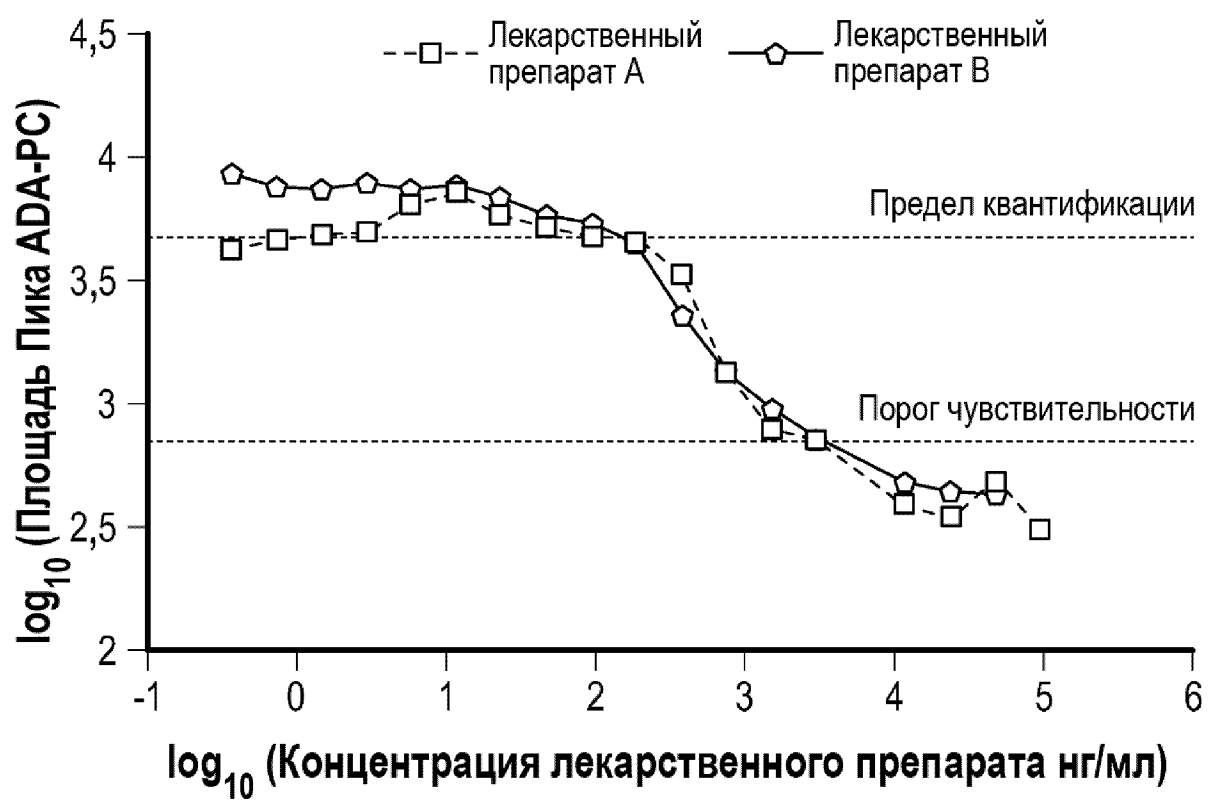
Фиг. 11



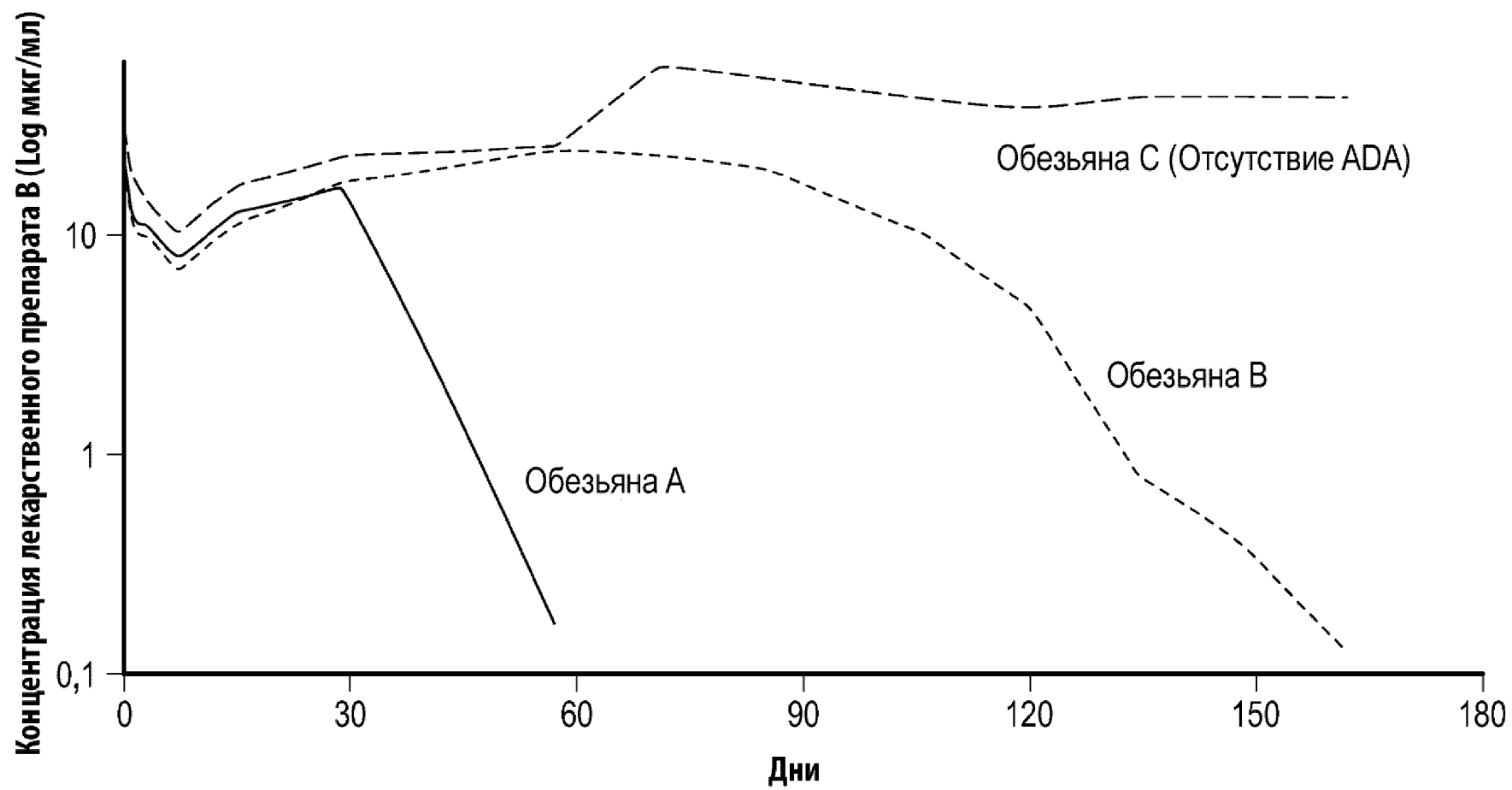
Фиг. 12



Фиг. 13

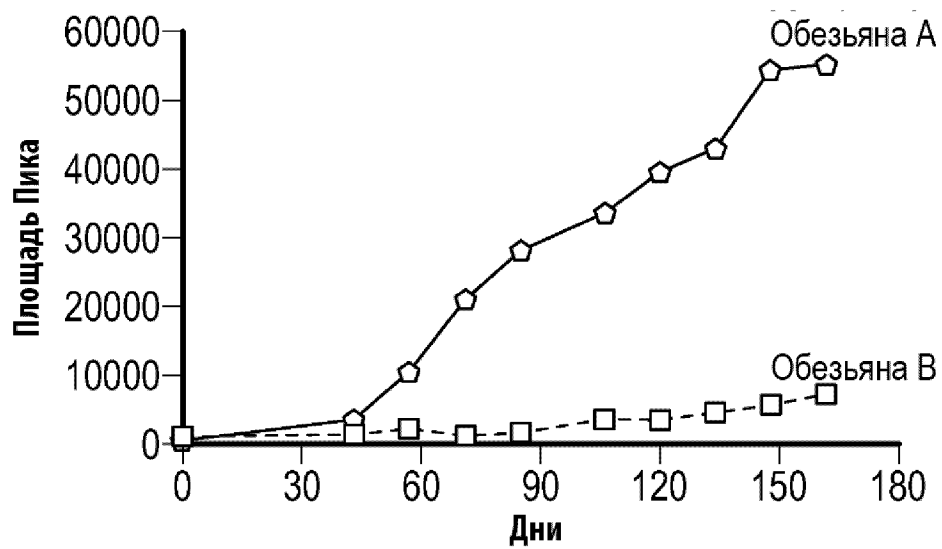


Фиг. 14

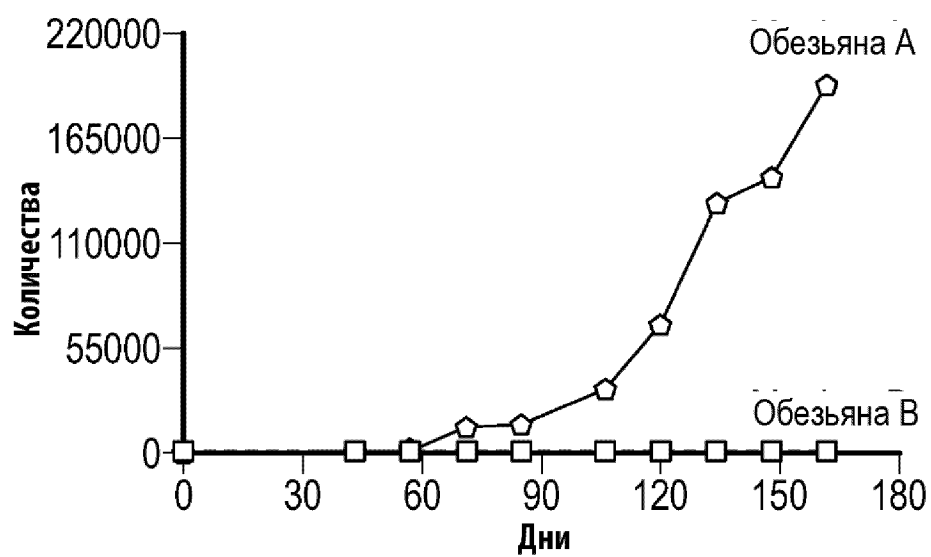


Фиг. 15

17/21

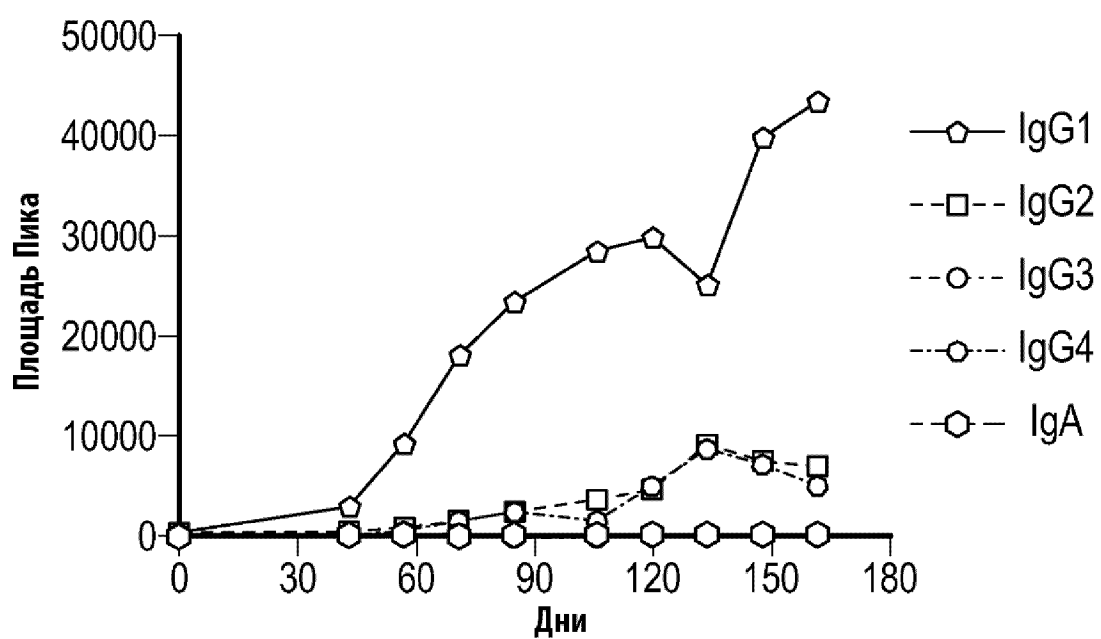


Фиг. 16А

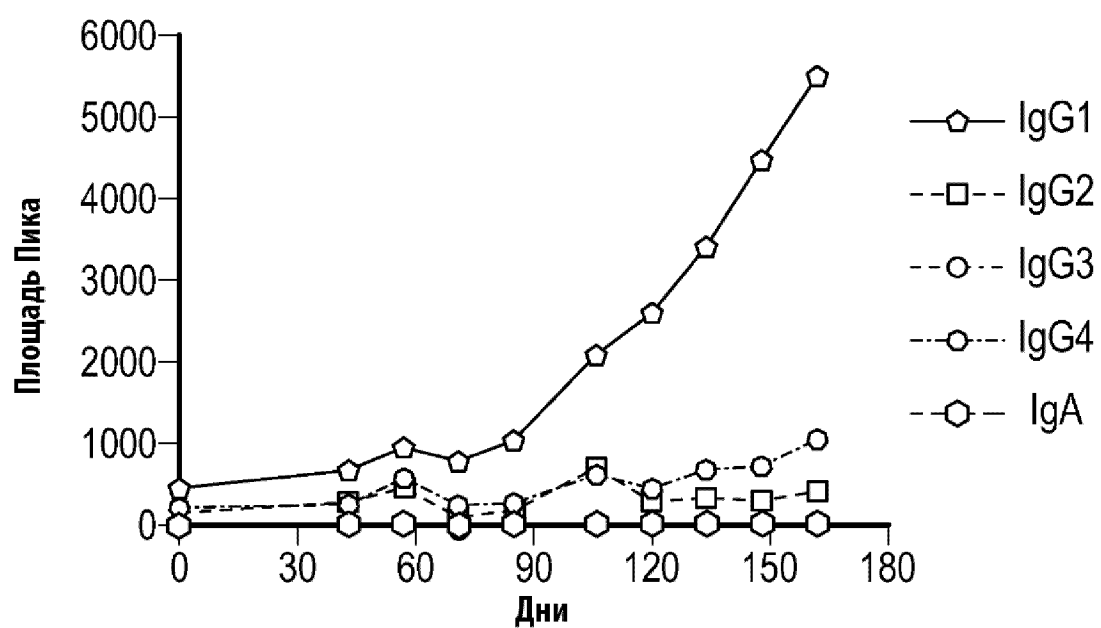


Фиг. 16В

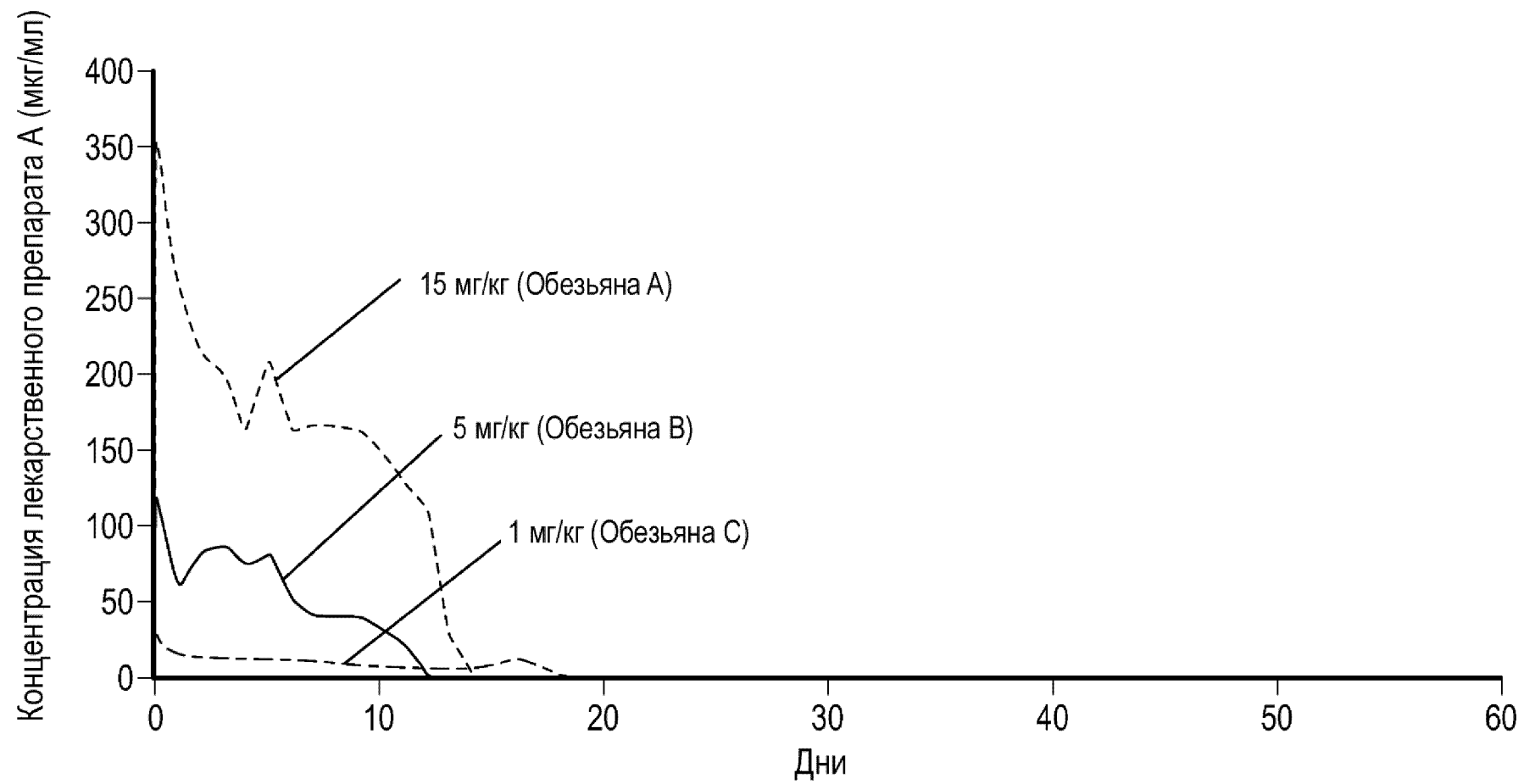
18/21



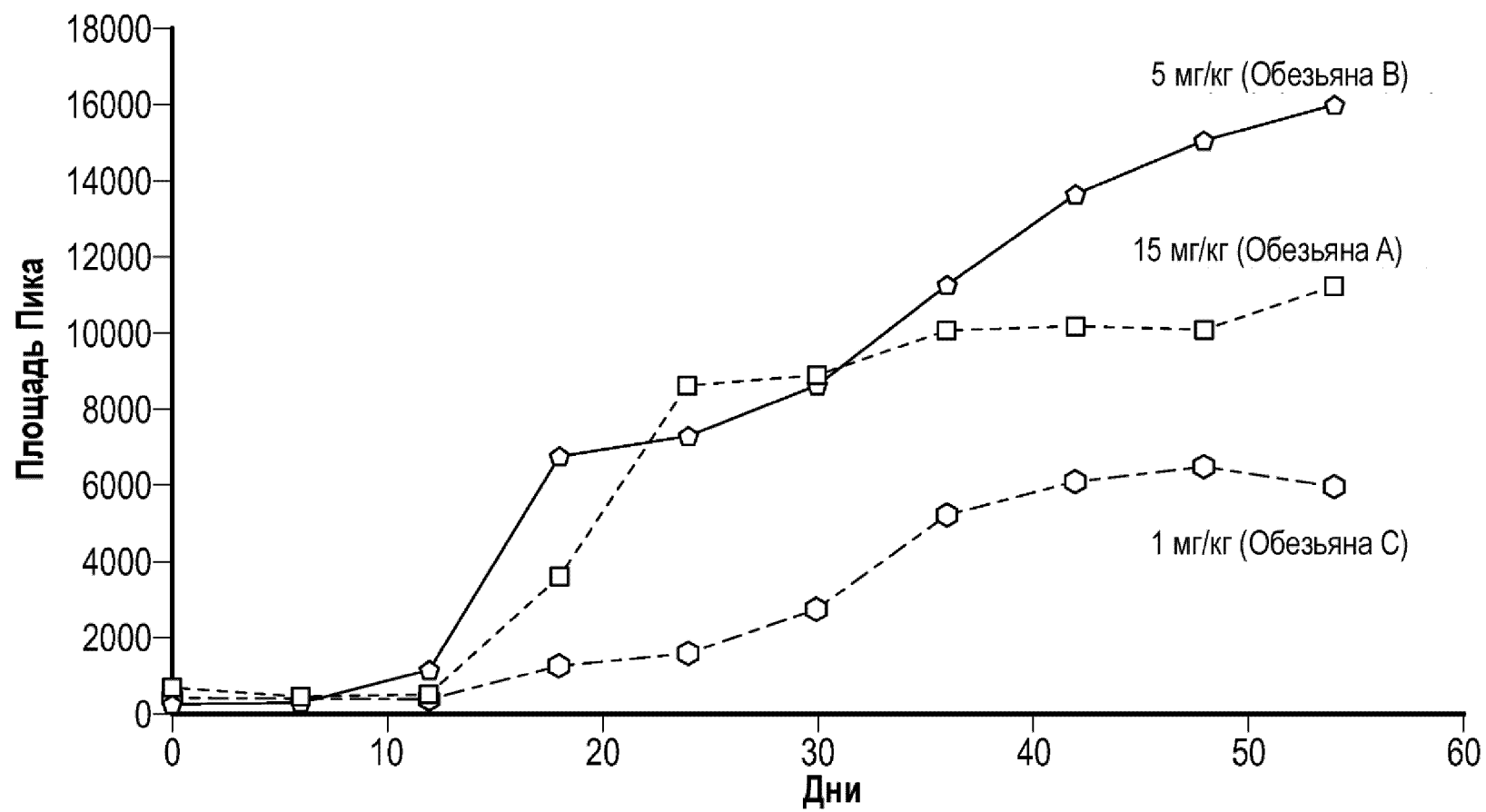
Фиг. 17А



Фиг. 17В



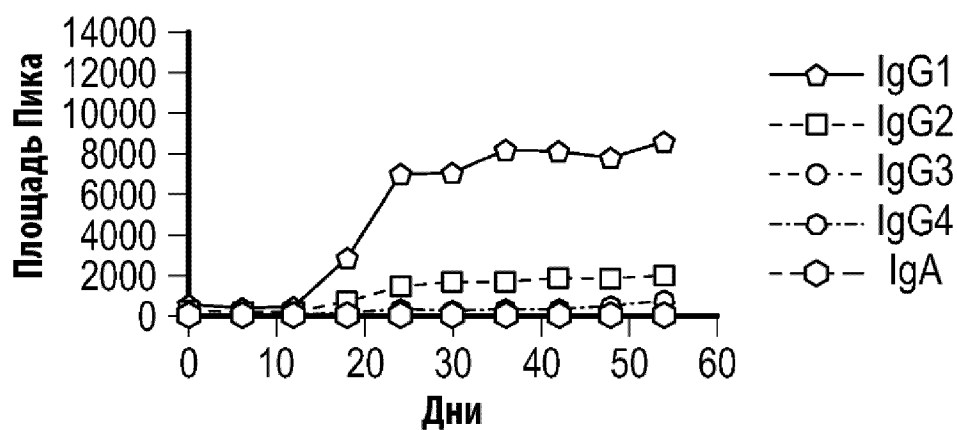
Фиг. 18



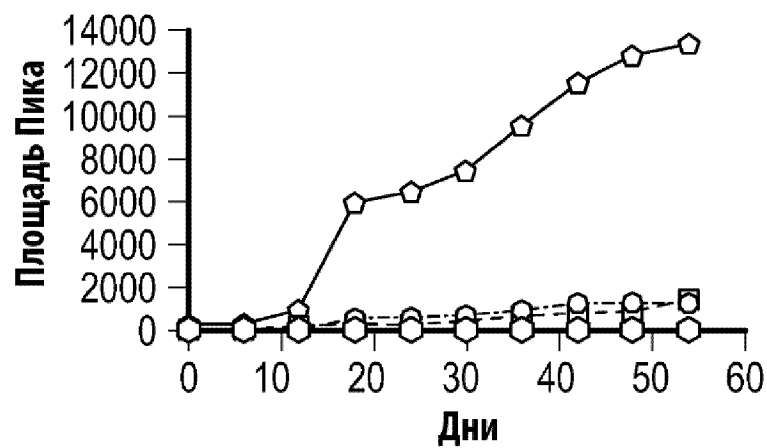
Фиг. 19

21/21

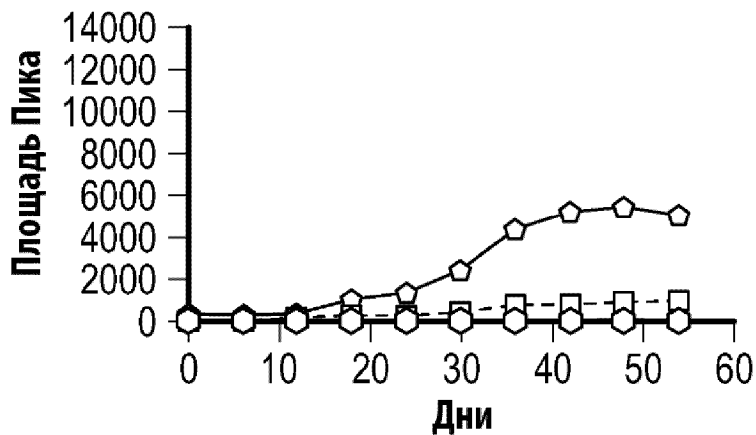
15 мг/кг (Обезьяна А)



5 мг/кг (Обезьяна В)



1 мг/кг (Обезьяна С)



Фиг. 20