

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290993** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.22

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)
B01D 15/32 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.27

**(54) ХРОМАТОГРАФИЯ ГИДРОФОБНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, СОПРЯЖЕННАЯ С
НАТИВНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ, ДЛЯ АНАЛИЗА АНТИТЕЛ**

(31) **62/907,465**

(32) **2019.09.27**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/052975**

(87) **WO 2021/062341 2021.04.01**

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Янь Юэтянь, Ванг Шунхай (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Согласно настоящему изобретению предложены быстрые высокочувствительные с высокой пропускной способностью способы и системы для характеристики пептидов или белков при помощи хроматографии гидрофобных взаимодействий, сопряженной с нативной масс-спектрометрией, для усовершенствования способа получения биофармацевтических продуктов, такого как идентификация примесей во время очистки антитела, наблюдение за вариантами посттрансляционных модификаций в ходе получения или характеристика соотношения лекарственного средства к антителу в конъюгатах антитела и лекарственного средства. Получают и сравнивают профили разделения пептидов или белков для идентификации или характеристики пептидов или белков.

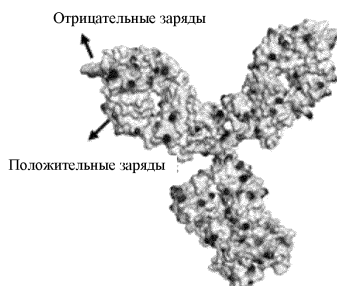


График заряда поверхности

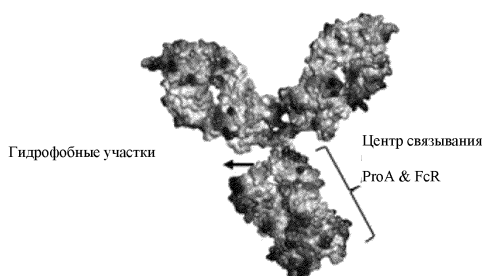


График гидрофобности поверхности

A1

202290993

202290993

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573811EA/042

ХРОМАТОГРАФИЯ ГИДРОФОБНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, СОПРЯЖЕННАЯ С НАТИВНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ, ДЛЯ АНАЛИЗА АНТИТЕЛ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к способам и системам для определения характеристик пептидов или белков при помощи хроматографии гидрофобного взаимодействия, сопряженной с нативной масс-спектрометрией. Согласно настоящему изобретению предложены быстрые, высокочувствительные, с высокой пропускной способностью способы и системы для определения характеристик пептидов или белков.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Для получения терапевтических пептидов или белков их экспрессируют в суспензии культуры клеток. Затем пептиды или белки очищают для удаления связанных со способом примесей. Качество продукта, свойственное очищенным терапевтическим пептидам или белкам, тщательно характеризуется, чтобы гарантировать сохранение соответствующих им профилей безопасности, эффективности и срока хранения, имеющих значение для фармакокинетики.

Изменения терапевтических пептидов или белков могут происходить в любой момент во время и после получения и/или очистки пептидов или белков. Терапевтические пептиды или белки могут становиться гетерогенными из-за различных посттрансляционных модификаций, разложения белка, ферментативных модификаций и химических модификаций. Эти изменения биофизических характеристик биофармацевтических продуктов могут влиять на соответствующую безопасность, эффективность и срок хранения.

Следует понимать, что существует нужда в разработке способов и систем анализа с высокой пропускной способностью, которые обеспечивают аналитическую картину для усовершенствования способа получения биофармацевтических продуктов. Весьма желательно, чтобы способ анализа можно было осуществлять в течение короткого времени для получения быстрого высокочувствительного аналитического инструмента для обеспечения критически важного усовершенствования в управлении получением и очисткой высококачественных биофармацевтических продуктов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Разработка способов и систем анализа с высокой пропускной способностью может быть критически важным для усовершенствования способа получения биофармацевтических продуктов благодаря наблюдению за получением и очисткой биофармацевтических продуктов. Согласно настоящему изобретению предложены способы и системы для удовлетворения вышеуказанных потребностей путем обеспечения быстрых высокочувствительных с высокой пропускной способностью способов и систем анализа на основе хроматографии гидрофобного взаимодействия, сопряженной с нативной масс-спектрометрией для усовершенствования способа получения

биофармацевтических продуктов.

Согласно настоящему изобретению, по меньшей мере отчасти, предложен способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце. В одном из аспектов способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце включает осуществление контакта образца с твердой поверхностью, причем указанная твердая поверхность содержит гидрофобную группу; промывку твердой поверхности подвижной фазой для получения по меньшей мере одного элюента, при этом элюент содержит по меньшей мере один пептид или белок; и определение характеристик по меньшей мере одного пептида или белка в по меньшей мере одном элюенте в неденатурирующих условиях при помощи масс-спектрометра.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает создание по меньшей мере одного профиля разделения.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение по меньшей мере одного пептида или белка на основании по меньшей мере одного профиля разделения.

В некоторых аспектах способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение уровня посттрансляционной модификации или варианта посттрансляционной модификации по меньшей мере одного пептида или белка на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение уровня гликозилирования или варианта гликозилирования по меньшей мере одного пептида или белка на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение изменений масс или относительной гидрофобности по меньшей мере одного пептида или белка на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает отделение или идентификацию примеси в образце на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

В некоторых аспектах по меньшей мере один пептид или белок представляет собой лекарственное средство, антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитела и лекарственного средства, фрагмент антитела или фармацевтический белковый продукт.

В некоторых примерах вариантов реализации способ дополнительно включает количественное определение отношения лекарственного средства к антителу в конъюгате антитела и лекарственного средства на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение расположения лекарственного средства, позиционного изомера или потерянной нагрузки в конъюгате антитела и лекарственного средства на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение модификации определяющего комплементарность участка антитела, биспецифического антитела, моноклонального антитела, конъюгата антитела и лекарственного средства или фрагмента антитела на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает хроматографическую колонку, содержащую твердую поверхность и гидрофобную группу.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает масс-спектрометр, сопряженный последовательно с хроматографической колонкой.

В некоторых аспектах гидрофобная группа представляет собой фенил, октил, бутил, гексил или пропил.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает делитель, применяемый для соединения масс-спектрометра с хроматографической колонкой.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает поток подпитки, посредством которого вводят подвижную фазу между масс-спектрометром и хроматографической колонкой.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает делитель, применяемый для выделения слабого потока в масс-спектрометр и сильного потока в детектор.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает масс-спектрометр, который представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением, тройной квадрупольный масс-спектрометр, квадрупольный масс-спектрометр или гибридный квадрупольный масс-

спектрометр для сверхвысокого диапазона масс.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает массовый анализатор Orbitrap.

Согласно настоящему изобретению, по меньшей мере отчасти, предложена система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка. В одном из аспектов система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка включает: образец, содержащий по меньшей мере один пептид или белок; хроматографическую колонку, содержащую гидрофобную группу, причем хроматографическая колонка выполнена с возможностью промывки подвижной фазой для получения элюента; масс-спектрометр, выполненный с возможностью характеристики или количественного определения по меньшей мере одного пептида или белка, причем масс-спектрометр выполнен с возможностью работы в неденатурирующих условиях и сопряжен последовательно с хроматографической колонкой.

В некоторых примерах вариантов реализации система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка дополнительно включает делитель, применяемый для соединения масс-спектрометра с хроматографической колонкой.

В некоторых аспектах система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка дополнительно включает делитель, применяемый для выделения слабого потока в масс-спектрометр и сильного потока в детектор.

В некоторых примерах вариантов реализации система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка дополнительно включает подвижную фазу, а получаемый элюент характеризуют при помощи масс-спектрометра в неденатурирующих условиях.

В некоторых примерах вариантов реализации система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка дополнительно включает поток подпитки, посредством которого вводят подвижную фазу между масс-спектрометром и хроматографической колонкой.

В некоторых примерах вариантов реализации система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка дополнительно включает диодно-матричный детектор или фотодиодно-матричный детектор.

В некоторых примерах вариантов реализации система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка дополнительно содержит по меньшей мере один пептид или белок, который представляет собой лекарственное средство, антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, гибридный белок, конъюгат антитела и лекарственного средства, фрагмент антитела или фармацевтический белковый продукт.

В некоторых аспектах система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка дополнительно включает масс-спектрометр, который представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с

ионизацией наноэлектрораспылением, тройной квадрупольный масс-спектрометр, квадрупольный масс-спектрометр или гибридный квадрупольный масс-спектрометр для сверхвысокого диапазона масс.

В некоторых примерах вариантов реализации система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка дополнительно включает массовый анализатор Orbitrap.

В некоторых примерах вариантов реализации система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка дополнительно включает гидрофобную группу, которая представляет собой фенил, октил, бутил, гексил или пропил.

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показаны график заряда поверхности и график гидрофобности поверхности молекулярной структуры антител.

На Фиг. 2 показана имитация SigmaMAb конъюгата антитела с лекарственным средством, например, имитация SigmaMAb Cys-связанного ADC, который содержит конъюгат SigmaMAb (MSQC4), моноклонального антитела IgG1, с флуорофором дансил посредством кросс-линкера LC-SMCC.

На фиг. 3 показаны схемы потоков в системах согласно настоящему изобретению, в которых масс-спектрометр сопряжен последовательно с ХГВ, и в которых применяют делитель для соединения масс-спектрометра и колонки ХГВ, согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 4 показаны варианты схемы потоков В согласно настоящему изобретению, например, схемы потоков В1 и В2 согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 5 показаны результаты испытания схемы потоков А согласно настоящему изобретению в виде профилей разделения по отношению к ХГВ-УФ (ультрафиолет), ХГВ-ПИХ (полная ионная хроматограмма) и необработанным масс-спектрам согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 6 показаны результаты испытания схемы потоков В1 согласно настоящему изобретению в виде профилей разделения по отношению к ХГВ-УФ, ХГВ-ПИХ и необработанным масс-спектрам согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 7 показаны результаты испытания схемы потоков В2 согласно настоящему изобретению в виде профилей разделения по отношению к ХГВ-УФ, ХГВ-ПИХ и необработанным масс-спектрам согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 8 показаны результаты испытания схемы потоков С согласно настоящему изобретению в виде профилей разделения по отношению к ХГВ-УФ, ХГВ-ПИХ и

необработанным масс-спектрам согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 9 показан быстрый скрининг вещества сравнения NISTmAb с полным разделением пиков гликоформ и точным измерением масс при помощи последовательной ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 10 показано разделение и детектирование гликозилированных вариантов смеси антител, содержащей шесть различных моноклональных антител, при помощи последовательной ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 11 показаны профили разделения ХГВ для имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC, предоставленные Sigma.

На Фиг. 12 показаны профили разделения имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC, полученные при помощи схемы B2 ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 13 показаны профили разделения имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC, полученные при помощи схемы С ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению по сравнению с профилем разделения, предоставленным Sigma, согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 14 показаны профили разделения имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC, соответствующие отношению лекарственного средства к антителу (DAR) для ADC, полученные при помощи схемы С ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 15 показаны профили разделения имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC, включая продукт разложения, полученные при помощи схемы С ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 16 показаны профили разделения для характеристики расположения лекарственных средств в имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC (DAR=2), полученные при помощи диссоциации в источнике в сочетании со способом ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 17 показаны профили разделения для характеристики позиционных изомеров в имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC (DAR=2 для продуктов разложения), полученные при помощи диссоциации в источнике в сочетании со способом ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 18 показаны профили разделения для характеристики расположения лекарственных средств в имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC (DAR=4), полученные при помощи диссоциации в источнике в сочетании со способом ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 19 показаны профили разделения для характеристики расположения лекарственных средств в имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC (DAR=6 или 8), полученные при помощи диссоциации в источнике в сочетании со способом ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 20 показаны профили разделения О-гликозилированных вариантов mAb-7 для характеристики модификаций в участке CDR, включая ПИХ, необработанные масс-спектры и деконволюированный масс-спектр, полученные при помощи ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 21 показаны профили разделения О-гликозилированных вариантов расщепленного mAb-7 для характеристики модификаций в участке CDR, включая ПИХ, необработанные масс-спектры и деконволюированный масс-спектр, полученные при помощи ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

На Фиг. 22 показан анализ О-гликозилированных вариантов CDR в mAb-7 с использованием нативной ГПХ-МС согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 23 показан анализ О-гликозилированных вариантов CDR в mAb-7 с использованием картирования восстановленных пептидов согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 24 показан профиль разделения вариантов mAb-8, полученный с использованием ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению для выявления изменений массы, соответствующих определенному окислению в участке CDR в mAb-8, согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 25 показан анализ вариантов окисления CDR в mAb-8 с использованием картирования восстановленных пептидов согласно примеру варианта реализации.

На Фиг. 26 показан профиль разделения необработанных масс-спектров для характеристики расположения потерянной нагрузки в ADC, полученный при помощи захвата энергии в источнике в сочетании со способом ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения. Для характеристики применяли имитацию SigmaMAb Cys-связанного ADC.

На Фиг. 27 показан профиль разделения деконволюированных масс-спектров для характеристики расположения потерянной нагрузки в ADC, полученный при помощи захвата энергии в источнике в сочетании со способом ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения. Для характеристики применяли имитацию SigmaMAb Cys-связанного ADC.

На Фиг. 28 показаны профили ХГВ-ПИХ и масс-спектр для характеристики молекулярных вариантов моноклональных антител, например, mAb-9 и mAb-10, при помощи ХГВ-нативной МС согласно примеру варианта реализации настоящего изобретения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Получение и производство биофармацевтических продуктов окружено различными способами и технологиями. После экспрессирования и получения терапевтических пептидов или белков в суспензии культуры клеток пептиды или белки могут быть очищены для удаления связанных со способом примесей. Очищенные терапевтические пептиды или белки могут тщательно характеризоваться, чтобы гарантировать сохранение

соответствующих им профилей безопасности, эффективности и срока хранения, имеющих значение для фармакокинетики, и признаков качества продукта.

Терапевтические пептиды или белки могут становиться гетерогенными из-за различных посттрансляционных модификаций (ПМТ), разложения белка, ферментативных модификаций и химических модификаций, которые могут быть введены в любой момент во время или после получения и очистки пептидов или белков. Идентификация и характеристика гетерогенных вариантов критически важны для контроля признаков качества биофизических характеристик биофармацевтических продуктов. В биофармацевтической промышленности существует нужда в быстрых высокочувствительных способах анализа с высокой пропускной способностью для управления и наблюдения за получением и очисткой терапевтических пептидов или белков, такого как получение моноклональных антител или конъюгатов антитела и лекарственного средства.

Биспецифические антитела представляют собой высокоценные биофармацевтические продукты, поскольку они могут быть нацелены на два различных антигена. Разработка биспецифических антител может быть направлена на нацеливание антител, специфических ко многим тканям, в сочетании с применением низкомолекулярных лекарственных средств, как например, комбинирование антител, специфических ко многим тканям, и цитотоксических лекарственных средств, для высвобождения лекарственных средств в непосредственной близости к опухолям. Низкомолекулярные лекарства могут быть конъюгированы с очищенными биспецифическими антителами для получения конъюгатов антитела и лекарственного средства (ADC). Экспрессирование и очистка биспецифических антител могут быть сопряжены с трудностями, из-за необходимости удаления примесей, такой как удаление исходных моноспецифических антител. Наблюдение и определение соотношений лекарственного средства к антителу в ADC также критически важно для контроля качества ADC.

Согласно настоящему изобретению предложены способы и системы для удовлетворения вышеуказанных потребностей путем обеспечения быстрых высокочувствительных с высокой пропускной способностью способов и систем анализа на основе хроматографии гидрофобного взаимодействия (ХГВ), последовательно сопряженной с нативной масс-спектрометрией (МС) для усовершенствования способа получения биофармацевтических продуктов, включая идентификацию примесей во время очистки антитела, наблюдение за вариантами посттрансляционных модификаций в ходе получения, характеристику соотношения лекарственного средства к антителу в ADC, характеристику смеси моноклональных антител для совместного включения в состав, определение относительной гидрофобности, определение интактных масс, определение профилей гликозилирования, характеристику структурных изменений или модификаций CDR (определяющего комплементарность участка) антител, таких как окисление или образование О-гликанов. В частности, способы и системы анализа согласно настоящему

изобретению могут быть высокочувствительными и их можно осуществлять в течение короткого времени для получения быстрого высокочувствительного с высокой пропускной способностью аналитического инструмента для обеспечения критически важного усовершенствования в управлении получением и очисткой биофармацевтических продуктов.

При рассмотрении графика заряда поверхности и графика гидрофобности поверхности молекулярной структуры антител, как показано на Фиг. 1, наблюдаются различные гидрофобные участки, доступные для разделения на основании гидрофобных взаимодействий. Гидрофобность различных моноклональных антител можно классифицировать с использованием относительного времени удержания в ходе анализа ХГВ. Разделение в ХГВ основано на гидрофобных взаимодействиях между поверхностями анализируемого вещества и неподвижной фазы. Гидрофобные группы, такие как фенил, октил, бутил, гексил или пропил, включены в неподвижную фазу для хроматографического разделения. ХГВ представляет собой широко применяемую автономную технологию неденатурирующего разделения для очистки и анализа моноклональных антител. ХГВ также широко применяют для характеристики биологических веществ, такой как характеристика фрагментации, неправильного сворачивания, окисления триптофана или метионина, изомеризации аспарагиновой кислоты, образования сукцинимидов или образования амидированного карбоксильного конца. Однако существуют ограничения, касающиеся сопряжения ХГВ с нативной МС для характеристики и разделения пептидов или белков, поскольку для связывания белков с учетом агрегации белков необходима высокая концентрация солей, такая как 3 М ацетат аммония. В предшествующих исследованиях ХГВ, последовательно сопряженной с МС, применяли специальный лиганд, такой как полипептид, который увеличивал гидрофобность для снижения требований к высокой концентрации соли в подвижной фазе. В этом исследовании ХГВ, сопряженной с МС, применяли капиллярный формат колонки с 1 М ацетатом аммония в подвижной фазе А (Chen et al., *Online hydrophobic interaction chromatography-mass spectrometry for the analysis of intact monoclonal antibodies*, *Anal. Chem.* 2018, 90, 7135-7138).

Согласно настоящему изобретению предложены различные схемы ХГВ, сопряженной с нативной МС, с различными схемами подпитки разделенных потоков для получения превосходных характеристик жидкостной хроматографии и высококачественных данных масс-спектрометрии. Можно применять подпитку потока воды для разбавления концентрации соли в подвижной фазе перед воздействием ионизации электрораспылением (ИЭР) или нано-ИЭР.

Нативная масс-спектрометрия представляет собой подход к изучению интактной биомолекулярной структуры в неденатурированном или близком к неденатурированному состоянию. Термин «нативный» относится к биологическому состоянию анализируемого вещества в растворе перед воздействием ионизации. Некоторые параметры раствора, содержащего биологические анализируемые вещества, такие как pH и ионная сила, можно

контролировать для поддержания неденатурированного состояния сворачивания биологических анализируемых соединений в растворе. В целом, нативная масс-спектрометрия основана на ионизации электрораспылением, при котором биологические анализируемые соединения распыляют из неденатурирующего растворителя. Другие термины, такие как нековалентная, с нативным распылением, с ионизацией электрораспылением, неденатурирующая, макромолекулярная или сурамолекулярная масс-спектрометрия, также можно применять для описания нативной масс-спектрометрии. (Leney et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom, 2017, 28, стр. 5-13, Native Mass Spectrometry: what is in the name (Нативная масс-спектрометрия: что означает название))

Согласно настоящему изобретению предложено разделение методом ХГВ, сопряженным с нативной масс-спектрометрией, на основе быстрого последовательного подхода, что обеспечивает мощный аналитический инструмент для быстрого высокочувствительного с высокой пропускной способностью скрининга или идентификации пептидов или белков. В способах и системах согласно настоящему изобретению профили разделения пептидов или белков могут быть получены на основании дифференциальных гидрофобных взаимодействий, после чего интактные биомолекулярные структуры пептидов или белков в неденатурированном или близком к неденатурированному состоянию можно характеризовать при помощи масс-спектрометрии.

Среди различных способов детектирования, которые могут быть сопряжены с ХГВ, масс-спектрометрия обеспечивает однозначную и точную идентификацию отдельных компонентов в сложных образцах. Некоторые параметры раствора, содержащего биологические анализируемые вещества, такие как диапазоны pH или концентрации солей, следует контролировать для поддержания неденатурированного состояния сворачивания биологических анализируемых соединений для проведения нативной масс-спектрометрии. Биологическое состояние анализируемых соединений, например, пептидов или белков, в растворе поддерживают в неденатурированном или близком к неденатурированному состоянию сворачивания после элюирования из колонки ХГВ и перед воздействием стадии ионизации масс-спектрометрии.

Способы и системы согласно настоящему изобретению полезны для обеспечения способов и систем с высокой пропускной способностью, которые обеспечивают механистическую аналитическую картину для усовершенствования способа получения терапевтических пептидов или белков. В частности, настоящее изобретение может обеспечить быстрые высокочувствительные с высокой пропускной способностью способы и системы для характеристики антител, вариантов антител или конъюгатов антитела и лекарственного средства благодаря комбинации ХГВ и нативной масс-спектрометрии интактного вещества.

В одном аспекте моноклональные антитела или варианты антител, содержащие специфические посттрансляционные модификации, оценивают при помощи способов и систем с высокой пропускной способностью согласно настоящему изобретению благодаря

комбинации ХГВ и нативной масс-спектрометрии интактного вещества. В некоторых предпочтительных примерах вариантов реализации способы и системы согласно настоящему изобретению можно применять для идентификации или количественного определения уровня посттрансляционной модификации или варианта посттрансляционной модификации моноклональных антител или вариантов антител.

В одном аспекте моноклональные антитела или варианты антител, содержащие специфическое гликозилирование, оценивают при помощи способов и систем с высокой пропускной способностью согласно настоящему изобретению благодаря комбинации ХГВ и нативной масс-спектрометрии интактного вещества. В некоторых предпочтительных примерах вариантов реализации способы и системы согласно настоящему изобретению можно применять для идентификации или количественного определения уровня гликозилирования или варианта гликозилирования моноклональных антител или вариантов антител, таких как выявление модификации О-гликозилирования или окисления в CDR. В некоторых предпочтительных примерах вариантов реализации способы и системы согласно настоящему изобретению можно применять для идентификации или количественного определения уровня гликозилирования или варианта гликозилирования моноклональных антител или вариантов антител с использованием основанного на гликанах разделения или изменения гликоформ.

В одном аспекте настоящего изобретения предложены высокочувствительные способы и системы анализа с высокой пропускной способностью для идентификации или количественного определения отношения лекарственного средства к антителу в конъюгате лекарственного средства и антитела при помощи способов и систем анализа с высокой пропускной способностью согласно настоящему изобретению благодаря комбинации ХГВ и нативной масс-спектрометрии интактного вещества. В некоторых предпочтительных примерах вариантов реализации анализируемый конъюгат антитела и лекарственного средства представляет собой лизин-связанный или цистеин-связанный конъюгат антитела и лекарственного средства. Настоящее изобретение особенно полезно благодаря обеспечению высокой пиковой производительности в сочетании с равномерным элюированием соединений при различных соотношениях антитела к лекарственному средству, в сочетании с высокочувствительным детектированием при помощи масс-спектрометрии в неденатурирующих условиях.

В одном аспекте настоящего изобретения предложены высокочувствительные способы и системы анализа с высокой пропускной способностью для идентификации или количественного определения моноклональных антител, вариантов антител, содержащих специфическое гликозилирование или смесей моноклональных антител для совместного включения в состав, благодаря комбинации ХГВ и нативной масс-спектрометрии интактного вещества.

Учитывая ограничения существующих способов, примеры вариантов реализации настоящего изобретения удовлетворяют давно назревшую потребность в обеспечении быстрых высокочувствительных с высокой пропускной способностью способов и систем

анализа на основе ХГВ, сопряженной с нативной масс-спектрометрией, для усовершенствования способа получения биофармацевтических продуктов, включая идентификацию примесей во время очистки антитела, наблюдение за вариантами посттрансляционных модификаций в ходе получения, характеризацию соотношения лекарственного средства к антителу в конъюгатах антитела и лекарственного средства и характеризацию смеси моноклональных антител для совместного включения в состав.

Термин в единственном числе следует понимать как обозначающий «по меньшей мере один»; и термины «примерно» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартное отклонение, как понятно специалисту в данной области техники; и в тех случаях, когда указаны диапазоны, включены крайние точки диапазонов.

Применяемые в данном документе термины «включает», «включают» и «включающий» не являются ограничивающими и понимаются как означающие «содержит», «содержат» и «содержащий», соответственно.

В некоторых примерах вариантов реализации предложен способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце, включающий: осуществление контакта образца с твердой поверхностью, причем указанная твердая поверхность содержит гидрофобную группу; промывку твердой поверхности подвижной фазой для получения по меньшей мере одного элюента, при этом элюент содержит по меньшей мере один пептид или белок; и определение характеристик по меньшей мере одного пептида или белка в по меньшей мере одном элюенте в неденатурирующих условиях при помощи масс-спектрометра. В некоторых примерах вариантов реализации настоящего изобретения предложена система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка, включающая: образец, содержащий по меньшей мере один пептид или белок; хроматографическую колонку, содержащую гидрофобную группу, причем хроматографическая колонка выполнена с возможностью промывки подвижной фазой для получения элюента; масс-спектрометр, выполненный с возможностью характеристики или количественного определения по меньшей мере одного пептида или белка, причем масс-спектрометр выполнен с возможностью работы в неденатурирующих условиях и сопряжен последовательно с хроматографической колонкой.

В настоящем описании термин «неденатурирующий» в описании «с использованием масс-спектрометра в неденатурирующих условиях» относится к биологическому состоянию анализируемого вещества в растворе перед воздействием ионизации. В настоящем описании термин «неденатурирующие условия» или «нативная масс-спектрометрия» могут включать осуществление масс-спектрометрии в условиях, препятствующих нековалентным взаимодействиям в анализируемом веществе. Для подробного обзора нативной масс-спектрометрии обратитесь к обзору: Elisabetta Boeri Erba & Carlo Petosa, The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes, 24 PROTEIN SCIENCE 1176-1192 (2015).

В настоящем описании термин «масс-спектрометр» включает устройство, выполненное с возможностью идентификации конкретных молекулярных фрагментов и

измерения их точных масс. Термин предназначен включать любой молекулярный детектор, в который может быть элюирован полипептид или пептид для детектирования и/или характеристики. Масс-спектрометр может включать три основных части: источник ионов, массовый анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Анализируемые атомы, молекулы или кластеры можно одновременно переносить в газовую фазу и ионизировать (как в ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов в значительной степени зависит от применения.

В некоторых примерах вариантов реализации в способе идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце, по меньшей мере один пептид или белок представляет собой лекарственное средство, антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, гибридный белок, конъюгат антитела и лекарственного средства, фрагмент антитела или фармацевтический белковый продукт.

В настоящем описании термин «пептид» или «белок» включает любой полимер аминокислот, содержащий ковалентные амидные связи. Белки содержат одну или более полимерных цепей аминокислот, как правило, известных в данной области техники как «пептиды» или «полипептиды». Белок может содержать один или более полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. В некоторых аспектах белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, белок клетки-хозяина или их комбинации.

[1] Применяемый в данном документе термин «фармацевтический белковый продукт» включает активный ингредиент, который может быть полностью или частично биологическим по природе. В некоторых примерах вариантов реализации белковый фармацевтический препарат может содержать пептид, белок, слитый белок, антитело, антиген, вакцину, конъюгат пептида и лекарственного средства, конъюгат антитела и лекарственного средства, конъюгат белка и лекарственного средства, клетки, ткани, или их комбинации. В некоторых примерах вариантов реализации белковый фармацевтический продукт может содержать рекомбинантную, сконструированную, модифицированную, мутантную или усеченную версию пептида, белка, слитого белка, антитела, антигена, вакцины, конъюгата пептида и лекарственного средства, продукта конъюгации антитела и лекарственного средства, конъюгата белка и лекарственного средства, клеток, тканей, или их комбинаций.

[2] В настоящем описании «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, область Fc, антигенсвязывающую или вариабельную область антитела. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fc, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов

антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию вариабельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых вариабельные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. Фрагмент антитела может быть получен различными средствами. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативно или химически путем 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 может необязательно включать одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может включать несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно включать мультимолекулярный комплекс.

[3] Применяемый в данном документе термин «конъюгат антитела и лекарственного средства» или «ADC» может относиться к антителу, присоединенному к биологически активному лекарственному средству (средствам) посредством линкера (линкеров) с лабильной связью (связями). ADC может содержать несколько молекул биологически активного лекарственного средства (или полезной 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, применяемое для ADC, может быть способно к связыванию с достаточным сродством для селективного накопления и длительного удерживания в участке-мишени. Большинство ADC могут иметь значения Kd в наномолярном диапазоне. Полезная нагрузка может иметь эффективность в наномолярном/пикомолярном диапазоне и может быть способна достигать внутриклеточных концентраций, достигаемых после распределения ADC в ткани-мишени. Наконец, линкер, который образует связь между полезной нагрузкой и антителом, может быть достаточно стабильным в системе кровообращения, чтобы использовать фармакокинетические свойства фрагмента антитела (например, длительный период полувыведения) и позволять полезной нагрузке оставаться присоединенной к антителу по мере того, как оно распределяется в тканях, но также должен обеспечивать эффективное высвобождение биологически активного лекарственного средства, как только ADC может быть поглощен клетками-мишенями. Линкер может включать линкеры, которые не расщепляются при внутриклеточной переработке, и линкеры, которые расщепляются, когда ADC достигает центра-мишени. В случае нерасщепляемых линкеров биологически активное лекарственное средство, высвобождаемое в клетке, включает полезную нагрузку и все элементы линкера, все еще присоединенные к аминокислотному остатку антитела, как правило, к остатку лизина или цистеина, после полного протеолитического разложения ADC внутри лизосомы. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, структура которых включает центр расщепления между полезной нагрузкой и аминокислотой центра присоединения к

антителу. Механизмы расщепления могут включать гидролиз кислото-неустойчивых связей в кислотных внутриклеточных пространствах, ферментативное расщепление амидных или сложноэфирных связей внутриклеточной протеазой или эстеразой и восстановительное расщепление дисульфидных связей восстановительной средой внутри клеток.

[4] В настоящем описании термин «антитело» должен относиться к иммуноглобулиновым молекулам, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: C_H1, C_H2 и C_H3. Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), с вставками более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца 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, без ограничения, антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. IgG включает подмножество антител.

[5] В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение уровня посттрансляционной модификации или варианта посттрансляционной модификации по меньшей мере одного пептида или белка на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

[6] В настоящем описании общий термин «посттрансляционные модификации» или «ПТМ» относится к ковалентным модификациям, которым подвергаются полипептиды, как во время (котрансляционная модификация), так и после (посттрансляционная модификация) их рибосомного синтеза. ПТМ в целом вводят при помощи специфических ферментов или ферментативных путей. Множество их происходит в месте специфической характеристической белковой последовательности (сигнатурная последовательность) в главной цепи белка. Было зарегистрировано несколько сотен ПТМ, и указанные модификации неизменно оказывают влияние на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. "Proteins" (2014) второе издание, опубликованное Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансляционные модификации включают, без ограничения, отщепление, N-концевые удлинения, разложение белка, ацилирование N-

конца, биотинилирование (ацилирование фрагментов лизина биотином), амидирование С-конца, гликозилирование, иодирование, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование (присоединение ацетильной группы, обычно на N-конце белка), алкилирование (присоединение алкильной группы (например, метил, этил, пропил), обычно на остатках лизина или аргинина), метилирование, аденилирование, АДФ-рибозилирование, ковалентные поперечные связи внутри полипептидной цепи или между цепями, сульфонирование, пренилирование, витамин С-зависимые модификации (гидроксилирование пролина и лизина и амидирование карбокси-конца), витамин К-зависимая модификация, при которой витамин К представляет собой кофактор карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты, приводящего к образованию γ -карбоксиглутамата (остаток glu), глутамилирование (ковалентное присоединение остатков глутаминовой кислоты), глицилирование (ковалентное присоединение остатков глицина), гликозилирование (присоединение гликозильной группы к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, приводящее к образованию гликопротеина), изопренилирование (присоединение изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липолирование (присоединение функциональной группы липоата), фосфопантетеинилирование (присоединение остатка 4'-фосфопантетеинила из кофермента А, как в биосинтезе жирной кислоты, поликетиды, нерибосомного пептида и лейцина), фосфорилирование (присоединение фосфатной группы, обычно к серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфирование (присоединение сульфатной группы, обычно к остатку тирозина). Посттрансляционные модификации, изменяющие химическую природу аминокислот, включают, без ограничения, цитруллинирование (превращение аргинина в цитруллин путем дезиминирования) и дезамидирование (превращение глутамина в глутаминовую кислоту или аспарагина в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, включающие структурные изменения, включают, без ограничения, образование дисульфидных мостиков (ковалентных связей между двумя аминокислотами цистеина) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). Некоторые посттрансляционные модификации включают присоединение других белков или пептидов, такие как ISGилирование (ковалентное присоединение белка ISG15 (ген, стимулированный интерфероном)), SUMOилирование (ковалентное присоединение белка SUMO (малый убиквитин-подобный модификатор)) и убиквитинирование (ковалентное присоединение белка убиквитина). См. источник информации European Bioinformatics Institute Protein Information ResourceSIB Swiss Institute of Bioinformatics, European Bioinformatics Institute Drs - Drosomycin precursor - *Drosophila melanogaster* (Fruit fly) - Drs gene & protein, <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> (последнее посещение 15 января 2019 г.) для более подробного контролируемого перечня ПТМ по рекомендациям UniProt.

[7] В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает отделение или идентификацию примеси в образце на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

[8] В настоящем описании термин «примесь» может включать любой нежелательный белок, присутствующий в белковом биофармацевтическом продукте. Примесь может включать примеси, связанные со способом и с продуктом. Кроме того, примесь может иметь известную структуру, быть частично охарактеризованной или неидентифицированной. Примеси, связанные со способом, могут быть получены в способе получения и могут включать три основные категории: полученные из клеточного субстрата, полученные из клеточной культуры и полученные ниже по технологической цепочке. Примеси, полученные из клеточного субстрата, включают, без ограничения, белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную из клеток хозяина, векторную или общую ДНК). Примеси, полученные из культуры клеток, включают, без ограничения, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, полученные ниже по технологической цепочке, включают, без ограничения, ферменты, реагенты для химической и биохимической обработки (например, цианогенбромид, гуанидин, окисляющие и восстанавливающие реагенты), неорганические соли (например, тяжелых металлов, мышьяка, неметаллического иона), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие вымываемые вещества. Примеси, связанные с продуктом (например, прекурсоры, некоторые продукты разложения), могут представлять собой молекулярные варианты, возникающие при получении и/или хранении, которые не обладают свойствами, сравнимыми со свойствами желаемого продукта, в отношении активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут требовать существенных усилий для выделения и характеристики с целью определения типа модификаций. Примеси, связанные с продуктом, могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются под действием гидролитических ферментов или химических реагентов, катализирующих расщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают, без ограничения, дезамидированные, изомеризованные, с неправильно образованными связями S-S, окисленные или измененные сопряженные формы (например, гликозилирование, фосфорилирование). Модифицированные формы могут также включать любую форму посттрансляционной модификации. Агрегаты включают димеры и более высокие повторения желаемого продукта. (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept. of Health and Humans Services).

В некоторых примерах вариантов реализации твердая поверхность, содержащая гидрофобную группу, включена в хроматографическую колонку.

В настоящем описании термин «хроматография» относится к способу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью или газом, может быть разделена на компоненты в результате различного распределения химических соединений по мере их протекания вокруг или поверх неподвижной жидкой или твердой фазы. Неорганические примеры хроматографии включают традиционную обращенно-

фазовую (RP), ионообменную (IEX), хроматографию со смешанным режимом и нормально-фазовую хроматографию (NP).

В некоторых примерах вариантов реализации в способе идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением, тройной квадрупольный масс-спектрометр, квадрупольный масс-спектрометр или гибридный квадрупольный масс-спектрометр для сверхвысокого диапазона масс.

В настоящем описании термин «ионизация электрораспылением» или «ИЭР» относится к способу распылительной ионизации, при котором катионы или анионы в растворе переносятся в газовую фазу путем образования и десольватирования при атмосферном давлении пара из сильно заряженных капелек, получаемого при приложении разности потенциалов между наконечником распыляющего капилляра, содержащего раствор, и противоэлектродом. В целом существует три основных стадии получения ионов в газовой фазе из ионов электролитов в растворе. Вот они: (a) получение заряженных капелек на нагнетающем наконечнике ЭР; (b) усыхание заряженных капелек благодаря испарению растворителя и повторному разрушению капелек, приводящее к получению маленьких сильно заряженных капелек, способных к образованию ионов в газовой фазе; и (c) механизм, благодаря которому образуются ионы в газовой фазе из очень маленьких и сильно заряженных капелек. Стадии (a)-(c) в целом протекают в области устройства с атмосферным давлением.

В настоящем описании термин «нано-электрораспыление» относится к ионизации электрораспылением с очень низким расходом растворителя, обычно в сотни нанолитров раствора образца в минуту или ниже, часто без применения внешней подачи растворителя. В настройках нагнетания электрораспыления, создающих наноэлектрораспыление, можно применять статический генератор наноэлектрораспыления или динамический генератор наноэлектрораспыления. Статический генератор наноэлектрораспыления проводит непрерывный анализ небольших объемов раствора образца (анализируемого вещества) в течение длительного времени. В динамическом генераторе наноэлектрораспыления применяют капиллярную колонку и систему подачи растворителя для осуществления хроматографического разделения смесей перед анализом на масс-спектрометре.

В некоторых примерах вариантов реализации масс-спектрометр включает масс-анализатор Orbitrap.

В настоящем описании термин «масс-анализатор» включает устройство, способное разделять фрагменты, то есть атомы, молекулы или кластеры, по их массе. Неорганические примеры масс-анализаторов, которые можно применять для быстрого секвенирования белков, включают времяпролетный (TOF), магнитоэлектрический сектор, квадрупольный фильтр масс (Q), квадрупольную ионную ловушку (QIT), Orbitrap, ионный циклотронный резонанс с Фурье-преобразованием (FTICR), а также методику масс-

спектрометрии с ускорителем (AMS).

Примеры вариантов реализации

Описанные варианты реализации обеспечивают композиции, способы и системы для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце на основе ХГВ, сопряженной с нативной масс-спектрометрией.

В некоторых примерах вариантов реализации предложен способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце, включающий: осуществление контакта образца с твердой поверхностью, причем указанная твердая поверхность содержит гидрофобную группу; промывку твердой поверхности подвижной фазой для получения по меньшей мере одного элюента, при этом элюент содержит по меньшей мере один пептид или белок; и определение характеристик по меньшей мере одного пептида или белка в по меньшей мере одном элюенте в неденатурирующих условиях при помощи масс-спектрометра. В некоторых примерах вариантов реализации настоящего изобретения предложена система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка, включающая: образец, содержащий по меньшей мере один пептид или белок; хроматографическую колонку, содержащую гидрофобную группу, причем хроматографическая колонка выполнена с возможностью промывки подвижной фазой для получения элюента; масс-спектрометр, выполненный с возможностью характеристики или количественного определения по меньшей мере одного пептида или белка, причем масс-спектрометр выполнен с возможностью работы в неденатурирующих условиях и сопряжен последовательно с хроматографической колонкой.

В некоторых примерах вариантов реализации способ или система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце основаны на ХГВ, сопряженной с нативной масс-спектрометрией, причем колонка ХГВ сопряжена последовательно с нативным масс-спектрометром, при этом для соединения масс-спектрометра с хроматографической колонкой применяют делитель. Для проведения ХГВ применяют ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография), снабженный колонкой ХГВ, для разделения первого уровня. Для ХГВ применяют подвижные фазы, содержащие ацетат аммония и/или сульфат аммония. В одном из примеров вариантов реализации концентрация ацетата аммония или сульфата аммония составляет примерно 0,5-5 М, примерно 1-4,5 М, примерно 2-3,5 М, более примерно 3 М или предпочтительно примерно 3 М.

В некоторых примерах вариантов реализации способ или система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце основаны на ХГВ, сопряженной с нативной масс-спектрометрией, причем колонка ХГВ сопряжена последовательно с нативным масс-спектрометром, при этом для соединения масс-спектрометра с хроматографической колонкой применяют делитель, при этом вводят подпитывающий поток в подвижную фазу между масс-спектрометром и хроматографической колонкой. Для проведения ХГВ применяют ВЭЖХ, снабженный колонкой ХГВ, для разделения первого уровня, при этом колонка ХГВ содержит

гидрофобную группу, такую как фенил, октил, бутил, гексил или пропил. В некоторых примерах вариантов реализации масс-спектрометрии включает масс-анализатор Orbitrap и применяет ионизацию электрораспылением (ИЭР).

В некоторых примерах вариантов реализации вставляют смесительный тройник после колонки ХГВ перед делителем, через который вводят подпитывающий поток в подвижную фазу. В некоторых примерах вариантов реализации расход подвижной фазы составляет примерно 100-500 мкл/мин, примерно 200-400 мкл/мин, примерно 250-350 мкл/мин или предпочтительно примерно 300 мкл/мин на входе в колонку ХГВ. В некоторых примерах вариантов реализации расход подвижной фазы после делителя в направлении ИЭР составляет примерно 0,1-3 мкл/мин, примерно 0,5-2,5 мкл/мин, примерно 0,5-2 мкл/мин, примерно 0,5-1,5 мкл/мин, примерно 0,5 мкл/мин, примерно 1 мкл/мин, примерно 1,5 мкл/мин, примерно 1,7 мкл/мин или предпочтительно менее примерно 2 мкл/мин. В некоторых примерах вариантов реализации расход подпитывающего потока подвижной фазы составляет примерно 100-1500 мкл/мин, примерно 250-1500 мкл/мин, примерно 300-1500 мкл/мин, примерно 800-1500 мкл/мин, примерно 1000-1300 мкл/мин, примерно 1000 мкл/мин, примерно 1100 мкл/мин, примерно 1300 мкл/мин или предпочтительно примерно 1200 мкл/мин на входе подвижной фазы в смесительный тройник.

В некоторых примерах вариантов реализации способ или система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце основаны на ХГВ, сопряженной с нативной масс-спектрометрией, причем колонка ХГВ сопряжена последовательно с нативным масс-спектрометром, при этом для соединения масс-спектрометра с хроматографической колонкой применяют делитель, при этом вводят подпитывающий поток в подвижную фазу между масс-спектрометром и хроматографической колонкой. В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение уровня посттрансляционной модификации или варианта посттрансляционной модификации по меньшей мере одного пептида или белка, уровня гликозилирования или варианта гликозилирования по меньшей мере одного пептида или белка, изменений массы по меньшей мере одного пептида или белка, относительной гидрофобности по меньшей мере одного пептида или белка, примеси в образце, фрагментации по меньшей мере одного пептида или белка, неправильного сворачивания по меньшей мере одного пептида или белка, окисления триптофана или метионина в по меньшей мере одном пептиде или белке, изомеризации аспарагиновой кислоты в по меньшей мере одном пептиде или белке, образования сукцинимидов в по меньшей мере одном пептиде или белке, или образования амидированного карбокси-конца в по меньшей мере одном пептиде или белке, на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

В некоторых примерах вариантов реализации способ или система для

идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце основаны на ХГВ, сопряженной с нативной масс-спектрометрией, причем колонка ХГВ сопряжена последовательно с нативным масс-спектрометром, при этом для соединения масс-спектрометра с хроматографической колонкой применяют делитель, при этом вводят подпитывающий поток в подвижную фазу между масс-спектрометром и хроматографической колонкой, при этом по меньшей мере один пептид или белок представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, конъюгат антитела и лекарственного средства или фрагмент антитела. В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение отношения антитела к лекарственному средству, расположения лекарственного средства, позиционного изомера или потерянной нагрузки в конъюгате антитела и лекарственного средства, на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

В некоторых примерах вариантов реализации способ идентификации по меньшей мере одного пептида или белка в образце дополнительно включает идентификацию или количественное определение модификации CDR антитела, биспецифического антитела, моноклонального антитела, конъюгата антитела и лекарственного средства или фрагмента антитела на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения, при этом модификация представляет собой О-гликозилирование или окисление, такое как окисление триптофана или окисление метионина.

Понтно, что способ или система согласно настоящему изобретению не ограничены вышеуказанными фармацевтическими продуктами, пептидами, белками, антителами, конъюгатами антитела с лекарственным средством, биофармацевтическими продуктами, хроматографической колонкой или масс-спектрометром.

Последовательное обозначение стадий способа, представленное в настоящем описании номерами и/или буквами, не предназначено для ограничения способа или любых вариантов реализации конкретным указанным порядком. В описании цитируются различные публикации, включая патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки на патенты, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих процитированных ссылок полностью включена в данный документ во всей полноте и для любых целей, посредством ссылки.

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

ПРИМЕРЫ

Материал и организация процесса

1.1 Сравнительный материал антител

В качестве сравнительного материала антител применяли NISTmAb. NISTmAb

представляет собой рекомбинантный гуманизированный IgG1κ, экспрессированный в суспензии культуры клеток мыши, и представляющий собой гомодимер двух одинаковых легких цепей и двух одинаковых тяжелых цепей. NISTmAb содержит малораспространенные посттрансляционные модификации, включая окисление метионина, дезаминирование и гликирование. Тяжелые цепи NISTmAb содержат N-концевое пироглутаминирование, C-концевое отщепление лизина и гликозилирование. NISTmAb был подробно охарактеризован и получен в суспензии культуры клеток мыши, и подвергнут прешварительной и последующей очистке согласно промышленному стандарту для удаления связанных со способом примесей.

2.1 Сравнительный материал ADC

Имитацию конъюгата антитела и лекарственного средства SigmaMAb (Millipore Sigma Inc.), такую как имитация Sigma Cys-связанного ADC, применяли в качестве сравнительного материала ADC. Имитацию продукта конъюгации антитела и лекарственного средства SigmaMAb применяли в качестве стандарта для масс-спектрометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии, которая содержала конъюгат SigmaMAb (MSQC4), моноклонального антитела IgG1, с флуорофором дансил посредством кросс-линкера LC-SMCC, как показано на Фиг. 2.

3.1 Организация процесса для ХГВ, сопряженной с нативной масс-спектрометрией, для идентификации пептидов или белков

Согласно настоящему изобретению предложены способы и системы ХГВ, сопряженной с нативной масс-спектрометрией, в которых колонка ХГВ сопряжена последовательно с масс-спектрометром, согласно различным схемам, и в которых применяют делитель для соединения масс-спектрометра и ХГВ, как показано на Фиг. 3. Одной из функций применения делителя является уменьшение расхода для подачи в масс-спектрометр. Было необходимо разбавить высокую концентрацию соли в подвижной фазе жидкостной хроматографии перед осуществлением МС детектирования. Для снижения высокой концентрации соли в подвижной фазе было разработано по меньшей мере три схемы организации процесса с минимальным мертвым объемом и градиентом на основе ацетата аммония, например, схемы путей потоков А, В и С, для включения подпитывающих и разделяющих схем потоков, как показано на Фиг. 3. В схеме В имеются варианты, например, схемы В1 и В2, как показано на Фиг. 4.

В схеме А, подпитывающий поток вводили в подвижную фазу между делителем и ИЭР, например, после делителя и перед ИЭР. В примере варианта реализации поток отходов/УФ из схемы А выделяли из делителя. Подвижная фаза в схеме А имела расход примерно 300 мкл/мин на входе в колонку ХГВ (примерно 4,6 мм). Расход подвижной фазы после делителя в направлении ИЭР составлял менее примерно 2 мкл/мин (примерно 20 мкм x 35 см) в схеме А.

В схеме В применяли делитель для подпитывающего потока и подпитывающий поток вводили в подвижную фазу в делителе или приблизительно сразу после делителя. Поток отходов/УФ (или отходов) в схеме В выделяли из делителя и/или перед ИЭР.

Варианты схемы В, например, В1 и В2, показаны на Фиг. 4. Расход подвижной фазы составлял примерно 300 мкл/мин на входе в колонку ХГВ (примерно 4,6 мм) в схеме В. Расход подвижной фазы после делителя в направлении ИЭР составлял примерно 12 мкл/мин (примерно 50 мкм) в схеме В. Подпитывающий поток в схеме В имел расход примерно 10 мкл/мин на входе в делитель.

В схеме С был добавлен смесительный тройник после колонки ХГВ перед делителем, при этом подпитывающий поток вводили в подвижную фазу в смесительном тройнике. Поток отходов/УФ в схеме С выделяли из делителя. Расход подвижной фазы на входе в колонку ХГВ (примерно 4,6 мм) составлял примерно 300 мкл/мин в схеме С. Расход подвижной фазы после делителя в направлении ИЭР составлял менее примерно 2 мкл/мин (примерно 20 мкм x 35 см) в схеме С. Подпитывающий поток в схеме С имел расход примерно 1200 мкл/мин на входе подвижной фазы в смесительный тройник.

Для сопряжения с масс-спектрометром применяли колонку ХГВ аналитического масштаба диаметром примерно 4,6 мм. Подвижную фазу А, содержащую высокую концентрацию ацетата аммония, такую как более 3 М, применяли для удерживания моноклональных антител или ADC на колонке ХГВ. НаноИЭР-МС применяли для улучшения чувствительности детектора и для улучшения переносимости высокой концентрации соли. Масс-спектрометрический анализ в способе или системе проводили в неденатурирующих условиях.

Для проведения нативной масс-спектрометрии применяли масс-спектрометр Thermo Scientific™ Q-Exactive™ UHMR (сверхвысокий диапазон масс). Масс-спектрометр имел массовый анализатор Orbitrap и работал с применением ионизации электрораспылением (ИЭР). Для ХГВ применяли совместимые с масс-спектрометрией подвижные фазы, содержащие ацетат аммония. Применяли делитель после колонки для выделения слабого потока к масс-спектрометру, оборудованному источником ионов с нанораспылением Nanospray Flex™, что обеспечивало возможность получения высокой чувствительности и рассеивания источника ионизации нанораспылением. Необработанные данные спектров масс-спектрометрии подвергали деконволюции при помощи программного обеспечения INTACT MASS™ от Protein Metrics.

ПРИМЕР 1. Испытание схем потоков

Схемы потоков с различными схемами подпитки и разделения потоков испытывали с использованием колонки ХГВ аналитического масштаба диаметром примерно 4,6 мм. Результаты испытания схемы А показаны на Фиг. 5 в виде профилей разделения в отношении ХГВ-УФ (ультрафиолет), ХГВ-ПИХ (полная ионная хроматограмма) и необработанных масс-спектров. В схеме А применяют непостоянную подачу подпитывающего потока через шприцевой насос. Поскольку давление от смешивания с подпиткой вызывало отсутствие потока от делителя или обратный поток, это приводило к плохой ПИХ. Кроме того, неэффективное смешивание вызвало плохое десольватирование, что приводило к плохому качеству данных МС.

Результаты испытания схем В1 и В2 показаны на Фиг. 6 и Фиг. 7, соответственно, в

виде профилей разделения в отношении ХГВ-УФ, ХГВ-ПИХ и необработанных масс-спектров. Результаты испытания схемы С показаны на Фиг. 8 в виде профилей разделения в отношении ХГВ-УФ, ХГВ-ПИХ и необработанных масс-спектров. Схема С показала хорошее сходство для УФ и ПИХ в сочетании с хорошим качеством и чувствительностью данных МС. УФ сигнал был ниже по причине разбавления и разделения.

ПРИМЕР 2. Скрининг NISTmAb

Способы и системы ХГВ, сопряженной с нативной масс-спектрометрией (ХГВ-нативная МС), согласно настоящему изобретению, применяли для идентификации и скрининга NISTmAb. Анализ при помощи масс-спектрометра проводили в неденатурирующих условиях. Масс-спектрометр был сопряжен последовательно с колонкой ХГВ, при этом применяли делитель для соединения масс-спектрометра и ХГВ, как показано в схеме С на Фиг. 3 и описано в разделе организации процесса. Для разделения ХГВ применяли совместимые с масс-спектрометрией подвижные фазы, содержащие ацетат аммония, для получения элюентов, содержащих NISTmAb, которые затем подвергали анализу при помощи нативной масс-спектрометрии. Материал сравнения NISTmAb разделяли и подвергали скринингу при помощи быстрого способа анализа с высокой пропускной способностью согласно настоящему изобретению.

Быстрый скрининг материала сравнения NISTmAb с полным разделением пиков гликоформ и точным измерением масс проводили при помощи последовательной ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению, как показано на Фиг. 9 согласно схеме С. NISTmAb представляет собой рекомбинантный гуманизированный IgG1κ, экспрессированный в суспензии культуры клеток мыши, который содержит малораспространенные посттрансляционные модификации, включая окисление метионина, дезаминирование и гликирование. Кроме того, тяжелые цепи NISTmAb содержат N-концевое пироглутаминирование, C-концевое отщепление лизина и гликозилирование. Варианты посттрансляционных модификаций и гликозилирования NISTmAb были хорошо охарактеризованы с полным разделением пиков. Несмотря на необходимость высоких концентраций соли для применения колонки ХГВ, близкое к неденатурированному состояние заряда NISTmAb поддерживалось на протяжении профиля разделения, что указывает на пренебрежимо малую денатурацию образца при применении способа и системы согласно настоящему изобретению. Результаты показывают хорошую производительность хроматографии и качество данных МС.

ПРИМЕР 3. Анализ смеси моноклональных антител

Смесь антител, содержащую шесть различных моноклональных антител, подвергали анализу при помощи ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению. Анализ при помощи масс-спектрометра проводили в неденатурирующих условиях. Масс-спектрометр был сопряжен последовательно с колонкой ХГВ, при этом применяли делитель для соединения масс-спектрометра и ХГВ, как показано в схеме С на Фиг. 3 и описано в разделе организации процесса. Для разделения ХГВ применяли совместимые с масс-спектрометрией подвижные фазы, содержащие ацетат аммония, для получения

элюентов, содержащих моноклональные антитела. Как показано на Фиг. 10, варианты гликозилирования моноклональных антител, такие как негликозилированное, частично гликозилированное, полностью гликозилированное и окисленное, можно разделять и детектировать с хорошим разрешением.

ХГВ-нативная МС согласно настоящему изобретению обеспечивает более короткое время жидкостной хроматографии, что можно рассматривать как высокую пропускную способность. Результаты испытания показали хорошую форму пиков с надежной хроматографией, подходящей для передачи способа. Кроме того, результаты показали хорошее качество данных МС для однозначного оперативного детектирования.

ПРИМЕР 4. Анализ Cys-связанного ADC

Профиль разделения ХГВ для имитации SigmaMAb Cys-связанного ADC был представлен Sigma, как показано на Фиг. 11. Имитацию SigmaMAb Cys-связанного ADC испытывали с использованием схемы В2 ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению. Результаты испытания схемы В2 показали хорошее подобие УФ и профиля ХГВ, представленного Sigma. Однако наблюдалось расширение пика МС с недостаточной интенсивностью сигнала МС, как показано на Фиг. 12.

Имитацию SigmaMAb Cys-связанного ADC испытывали с использованием схемы С ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению по сравнению с профилем, представленным Sigma, как показано на Фиг. 13. Профиль ХГВ-ПИХ, полученный при помощи ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению, был похож на профиль ХГВ, представленный Sigma. Наблюдалось минимальное расширение пика с достаточной интенсивностью сигнала МС. Все детектированные при помощи ПИХ пики можно было отнести на основании масс-спектров к DAR или продуктам разложения, как показано на Фиг. 14 и Фиг. 15.

ПРИМЕР 5. Характеризация расположения лекарственных средств и позиционных изомеров в ADC

Для характеристики расположения лекарственных средств и/или позиционных изомеров в ADC, проводили диссоциацию в источнике в сочетании со способом ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению по схеме С. Для характеристики расположения лекарственных средств и/или позиционных изомеров применяли имитацию SigmaMAb Cys-связанного ADC. Полученные профили разделения можно идентифицировать для характеристики расположения конъюгированного лекарственного средства в тяжелой или легкой цепи в соответствующем соотношении лекарственного средства к антителу, включая продукты разложения и позиционные изомеры, как показано на Фиг. 16 (DAR=2), Фиг. 17 (DAR=2 для продуктов разложения), Фиг. 18 (DAR=4) и Фиг. 19 (DAR=6 или 8).

ПРИМЕР 6. Характеризация модификаций в CDR

Способы и системы ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению применяли для характеристики модификаций в CDR в моноклональных антителах, например, mAb-7 и mAb-8. Как показано на Фиг. 20, профили ХГВ-ПИХ mAb-7 показали

профиль разделения вариантов гликозилирования mAb-7, например, главный пик, пик 1 (P1) и пик 2 (P2). Необработанные спектральные данные масс-спектрометрии mAb-7 были подвергнуты деконволюции при помощи программного обеспечения. Подвергнутый деконволюции масс-спектр mAb-7 показал профили разделения вариантов гликозилирования, которые выявили специфические варианты О-гликозилирования CDR в mAb-7.

Домен-специфические модификации были дополнительно охарактеризованы путем расщепления mAb-7 под действием FabRICATOR, например, IdeS, который представляет собой цистеинпротеазу, расщепляющую антитела в специфическом центре ниже шарнирной области с образованием фрагментов F(ab')₂ и Fc/2. Как показано на Фиг. 21, профили ХГВ-ПНХ расщепленного mAb-7 показали профиль разделения домен-специфических вариантов гликозилирования mAb-7. Необработанные спектральные данные масс-спектрометрии были подвергнуты деконволюции при помощи программного обеспечения. Подвергнутый деконволюции масс-спектр mAb-7 показал профили разделения домен-специфических вариантов гликозилирования, которые выявили специфические варианты О-гликозилирования CDR в mAb-7. Варианты О-гликозилирования mAb-7 дополнительно анализировали при помощи ортогональных способов, включая нативную ГПХ (гельпроникающая хроматография), МС и картирование восстановленных пептидов, как показано на Фиг. 22 и Фиг. 23.

Способы и системы ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению применяли для характеристики модификаций в CDR в mAb-8, таких как окисление. Как показано на Фиг. 24, профили ХГВ-ПНХ mAb-8 показали профиль разделения вариантов mAb-8, например, главный пик и пик 1 (P1). Необработанные спектральные данные масс-спектрометрии mAb-8 были подвергнуты деконволюции при помощи программного обеспечения. Подвергнутый деконволюции масс-спектр mAb-8 показал профили разделения вариантов масс, такие как изменения масс 15,6 Да, которые выявили специфическое окисление в CDR в mAb-8. Варианты окисления mAb-8 дополнительно анализировали при помощи картирования восстановленных пептидов, как показано на Фиг. 25. Результаты выявили окисление метионина в положении 54 тяжелой цепи mAb-8.

ПРИМЕР 7. Характеризация потерянной нагрузки ADC

Для характеристики расположения потерянной нагрузки в ADC применяли захват энергии в источнике в сочетании со способом ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению. Для характеристики применяли имитацию SigmaMAb Cys-связанного ADC. Полученные профили разделения можно идентифицировать для характеристики потерянной нагрузки, как показана на Фиг. 26 и Фиг. 27.

ПРИМЕР 8. Характеризация молекулярных вариантов антител

Способы и системы ХГВ-нативной МС согласно настоящему изобретению применяли для характеристики молекулярных вариантов моноклональных антител, например, mAb-9 и mAb-10. Как показано на Фиг. 28, профили ХГВ-ПНХ mAb-9 и mAb-10 показали профиль разделения молекулярных вариантов. Масс-спектр показал профили

разделения молекулярных вариантов, которые выявили специфические изменения масс молекулярных вариантов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

осуществление контакта образца с твердой поверхностью, причем указанная твердая поверхность содержит гидрофобную группу;

промывку твердой поверхности с использованием подвижной фазы для получения по меньшей мере одного элюента, при этом элюент содержит по меньшей мере один пептид или белок; и

характеризацию по меньшей мере одного пептида или белка в по меньшей мере одном элюенте в неденатурирующих условиях при помощи масс-спектрометра.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий создание по меньшей мере одного профиля разделения.

3. Способ по п. 2, дополнительно включающий идентификацию или количественное определение по меньшей мере одного пептида или белка на основании по меньшей мере одного профиля разделения.

4. Способ по п. 2, дополнительно включающий идентификацию или количественное определение уровня посттрансляционной модификации или варианта посттрансляционной модификации по меньшей мере одного пептида или белка на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

5. Способ по п. 2, дополнительно включающий идентификацию или количественное определение уровня гликозилирования или варианта гликозилирования по меньшей мере одного пептида или белка на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

6. Способ по п. 2, дополнительно включающий идентификацию или количественное определение изменений масс или относительной гидрофобности по меньшей мере одного пептида или белка на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

7. Способ идентификации по п. 2, дополнительно включающий отделение или идентификацию примеси в образце на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

8. Способ по п. 2, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один пептид или белок представляет собой лекарственное средство, антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитела и лекарственного средства, фрагмент антитела или фармацевтический белковый продукт.

9. Способ по п. 8, дополнительно включающий количественное определение отношения лекарственного средства к антителу в конъюгате антитела и лекарственного средства на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

10. Способ по п. 8, дополнительно включающий идентификацию или

количественное определение расположения лекарственного средства, позиционного изомера или потерянной нагрузки в конъюгате антитела и лекарственного средства на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

11. Способ по п. 8, дополнительно включающий идентификацию или количественное определение модификации определяющего комплементарность участка антитела, биспецифического антитела, моноклонального антитела, конъюгата антитела и лекарственного средства или фрагмента антитела на основании по меньшей мере одного профиля разделения или сравнения с другим профилем разделения.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что твердая поверхность, содержащая гидрофобную группу, включена в хроматографическую колонку.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что масс-спектрометр последовательно сопряжен с хроматографической колонкой.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что гидрофобная группа представляет собой фенил, октил, бутил, гексил или пропил.

15. Способ по п. 13, отличающийся тем, что в нем применяют делитель для соединения масс-спектрометра с хроматографической колонкой.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что поток подпитки вводят в подвижную фазу между масс-спектрометром и хроматографической колонкой.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что делитель применяют для выделения слабого потока в масс-спектрометр и сильного потока в детектор.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением, тройной квадрупольный масс-спектрометр, квадрупольный масс-спектрометр или гибридный квадрупольный масс-спектрометр для сверхвысокого диапазона масс.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр включает массовый анализатор Orbitrap.

20. Система для идентификации по меньшей мере одного пептида или белка, включающая:

образец, содержащий по меньшей мере один пептид или белок;

хроматографическую колонку, содержащую гидрофобную группу, причем хроматографическая колонка выполнена с возможностью промывки подвижной фазой для получения элюента; и

масс-спектрометр, выполненный с возможностью характеристики или количественного определения по меньшей мере одного пептида или белка, причем масс-спектрометр выполнен с возможностью работы в неденатурирующих условиях и сопряжен последовательно с хроматографической колонкой.

21. Система по п. 20, отличающаяся тем, что в ней применяют делитель для соединения масс-спектрометра с хроматографической колонкой.

22. Система по п. 21, отличающаяся тем, что делитель применяют для выделения слабого потока в масс-спектрометр и сильного потока в детектор.

23. Система по п. 20, отличающаяся тем, что элюент характеризуют при помощи масс-спектрометра в неденатурирующих условиях.

24. Система по п. 20, отличающаяся тем, что поток подпитки вводят в подвижную фазу между масс-спектрометром и хроматографической колонкой.

25. Система по п. 20, отличающаяся тем, что указанная система включает диодно-матричный детектор или фотодиодно-матричный детектор.

26. Система п. 20, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один пептид или белок представляет собой лекарственное средство, антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитела и лекарственного средства, фрагмент антитела или фармацевтический белковый продукт.

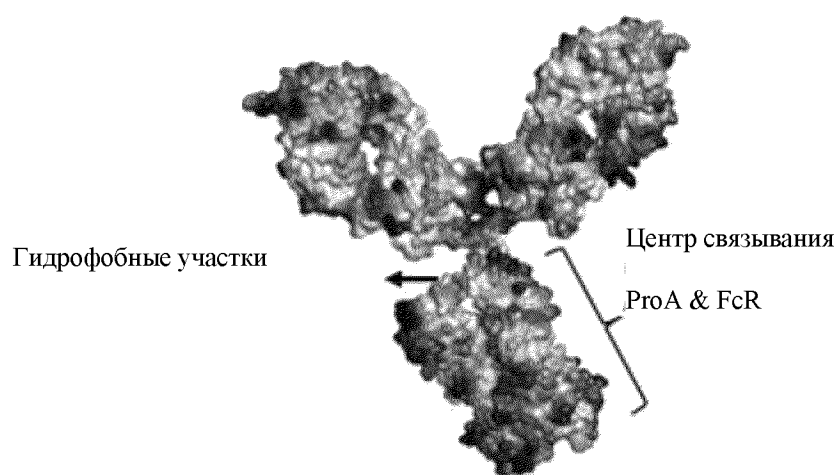
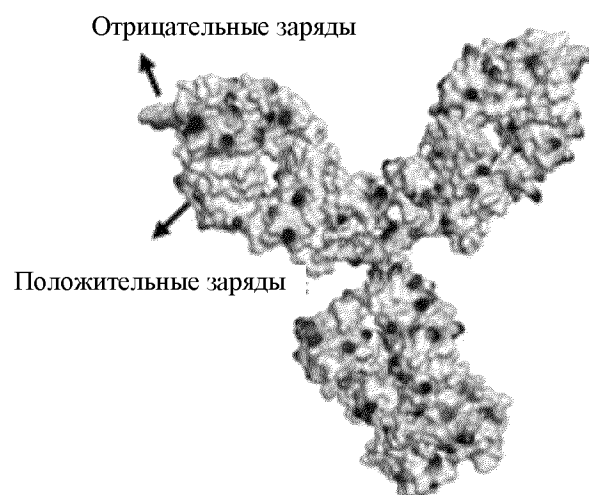
27. Система по п. 20, отличающаяся тем, что масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением, тройной квадрупольный масс-спектрометр, квадрупольный масс-спектрометр или гибридный квадрупольный масс-спектрометр для сверхвысокого диапазона масс.

28. Система по п. 20, отличающаяся тем, что масс-спектрометр включает массовый анализатор Orbitrap.

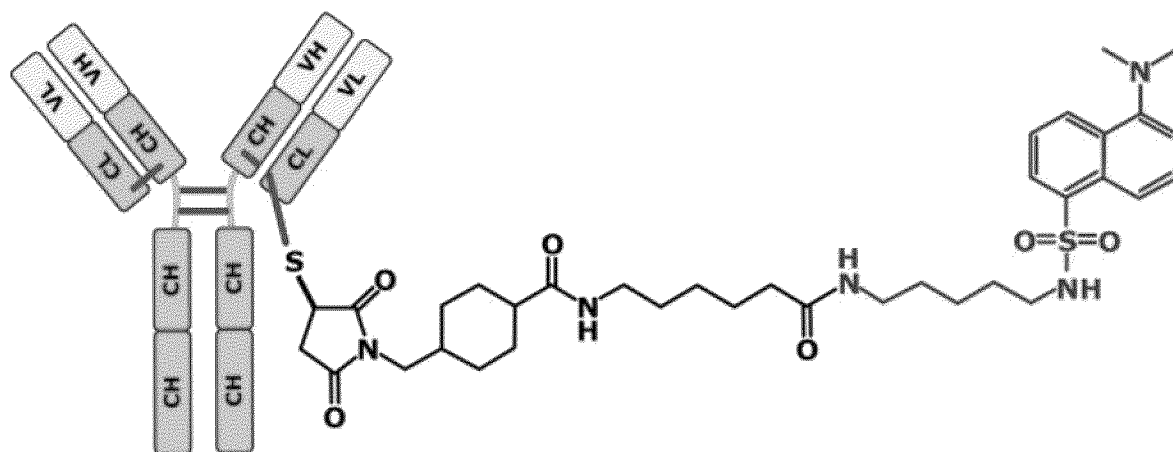
29. Система по п. 20, отличающаяся тем, что гидрофобная группа представляет собой фенил, октил, бутил, гексил или пропил.

По доверенности

ФИГ. 1.



ФИГ. 2.



ФИГ. 3.

Схема потоков А:

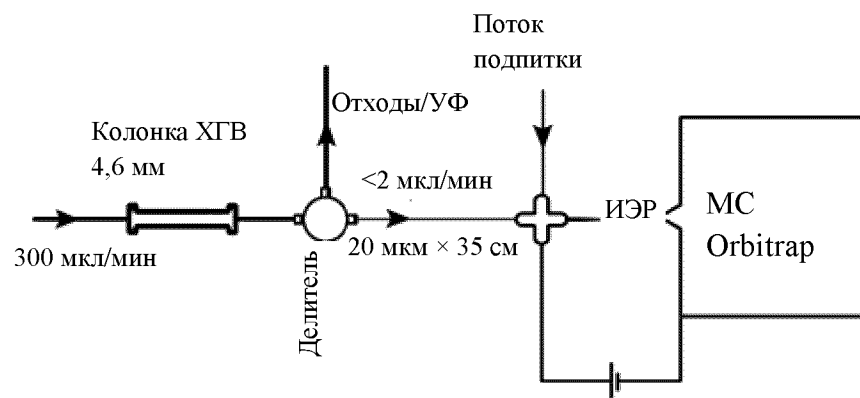


Схема потоков В:

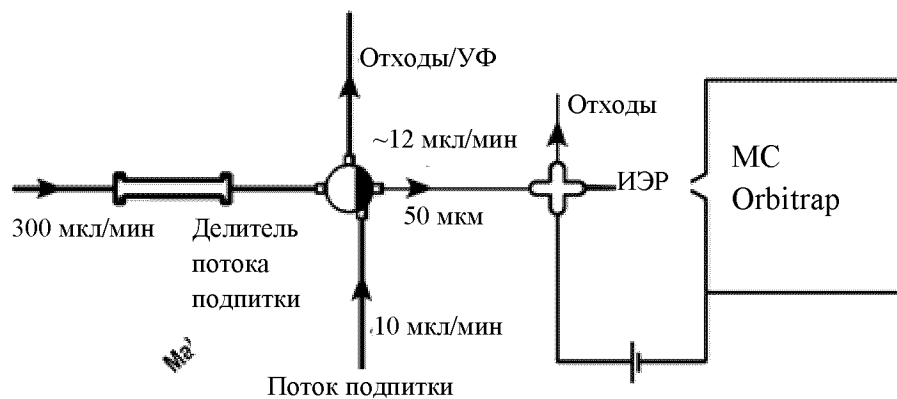
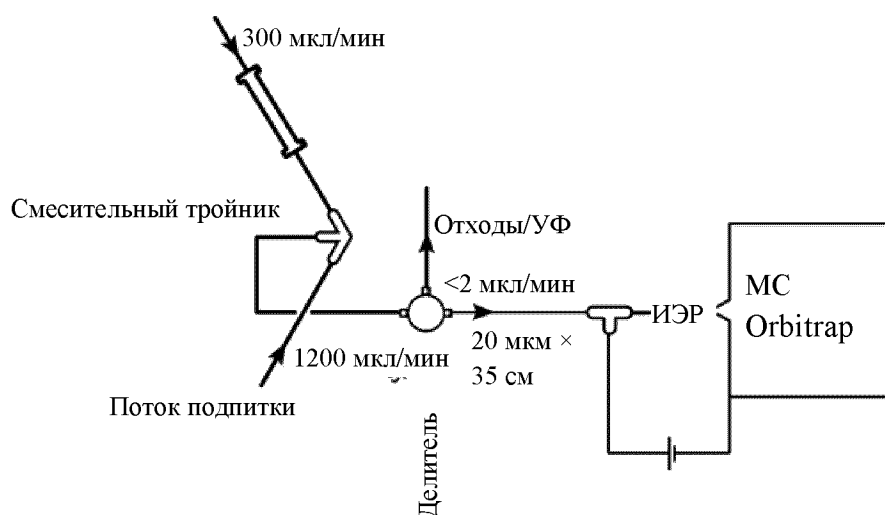
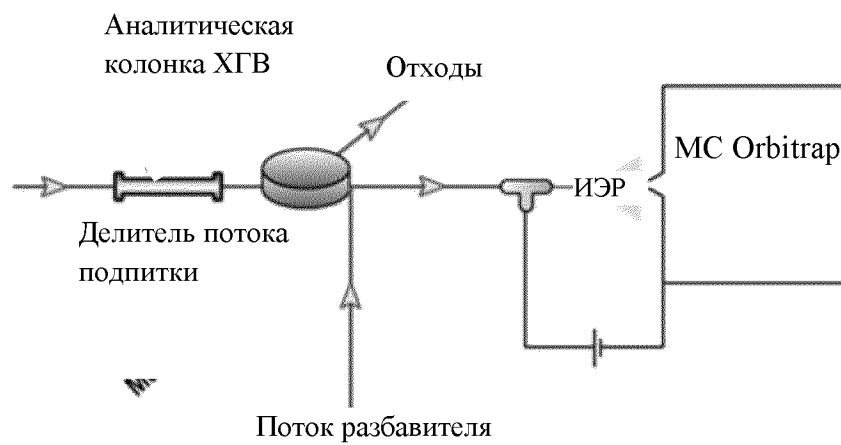
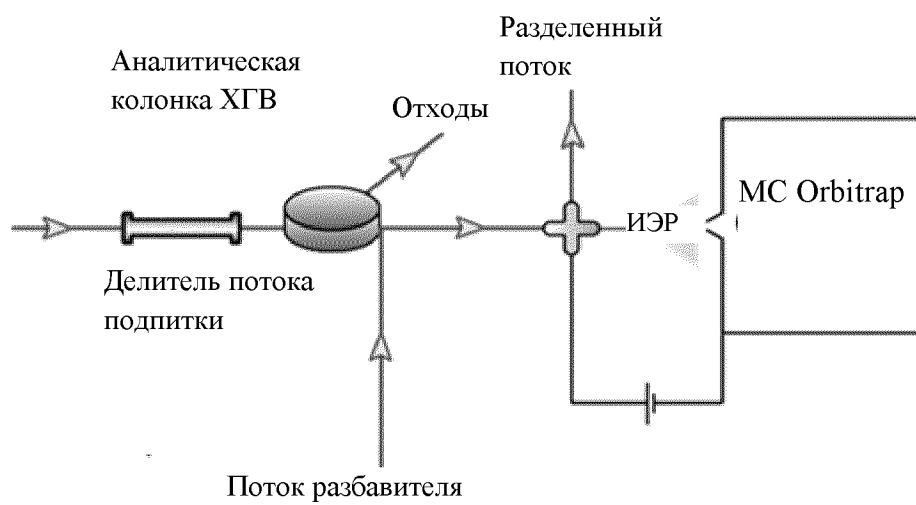


Схема потоков С:

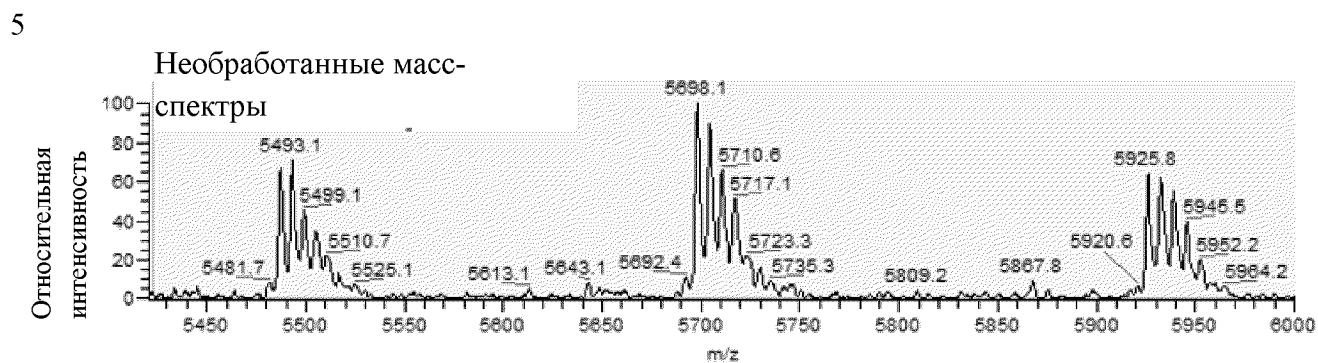
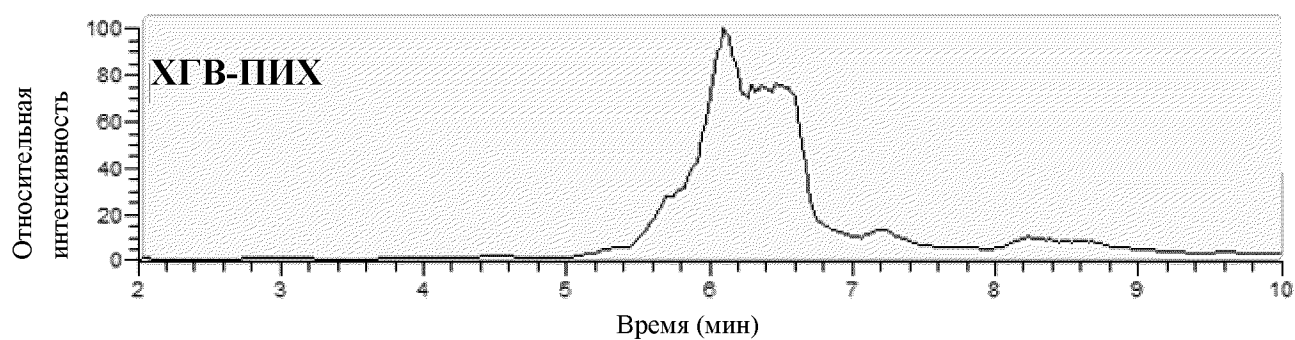
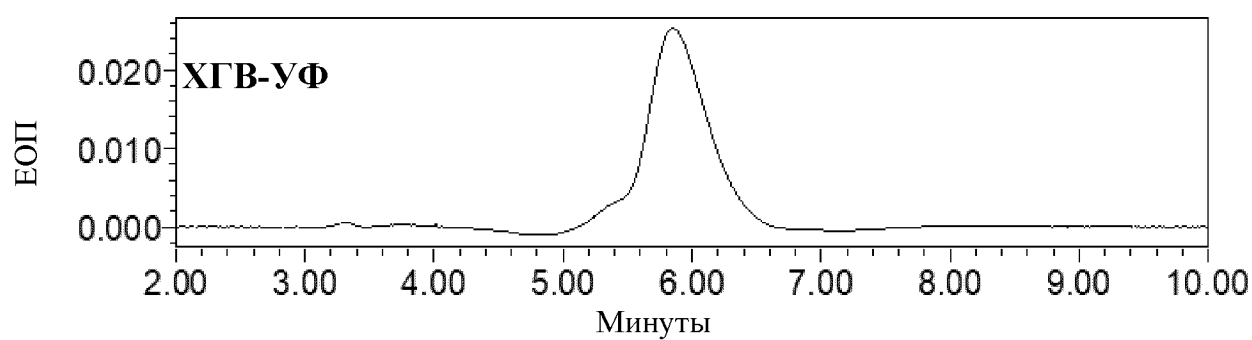


ФИГ. 4.

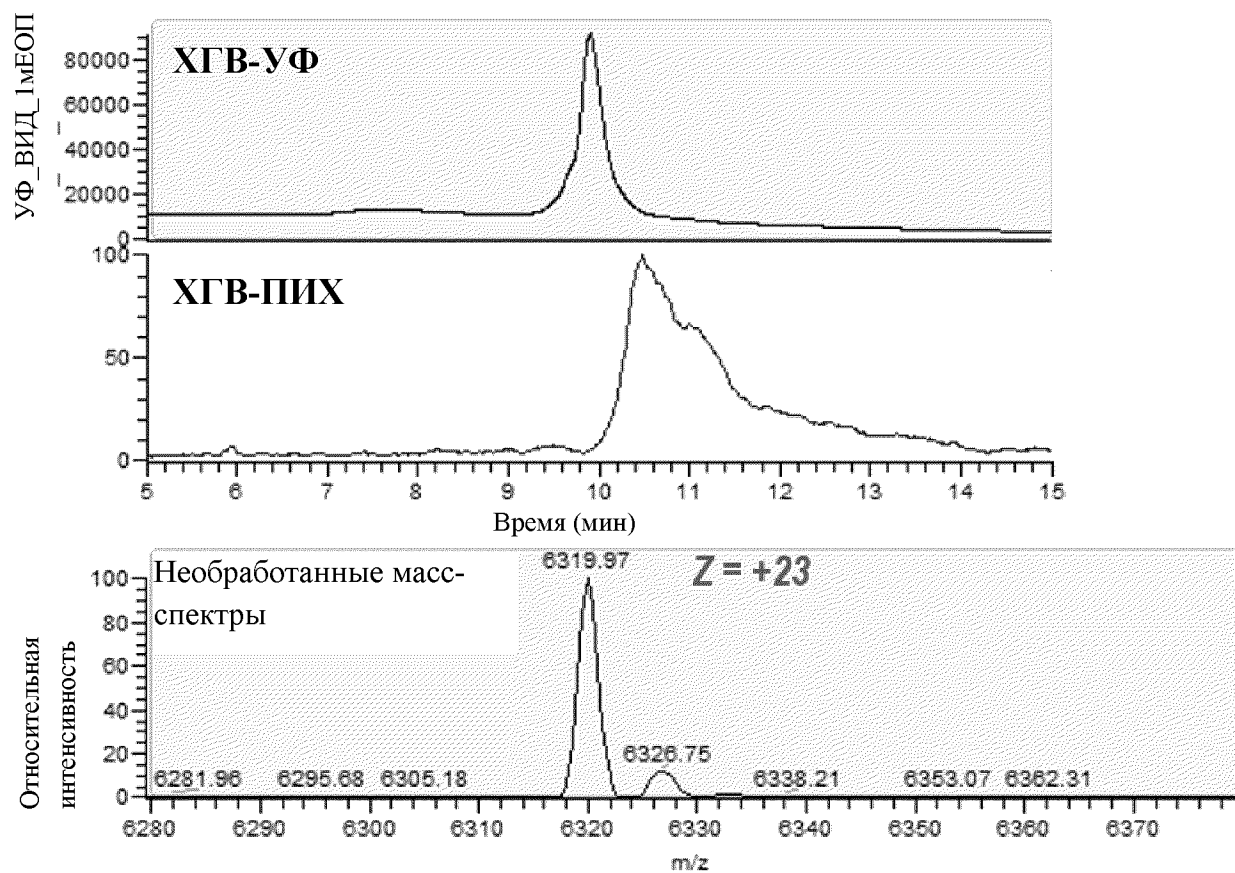
Схема В1:**Схема В2:**

5/28

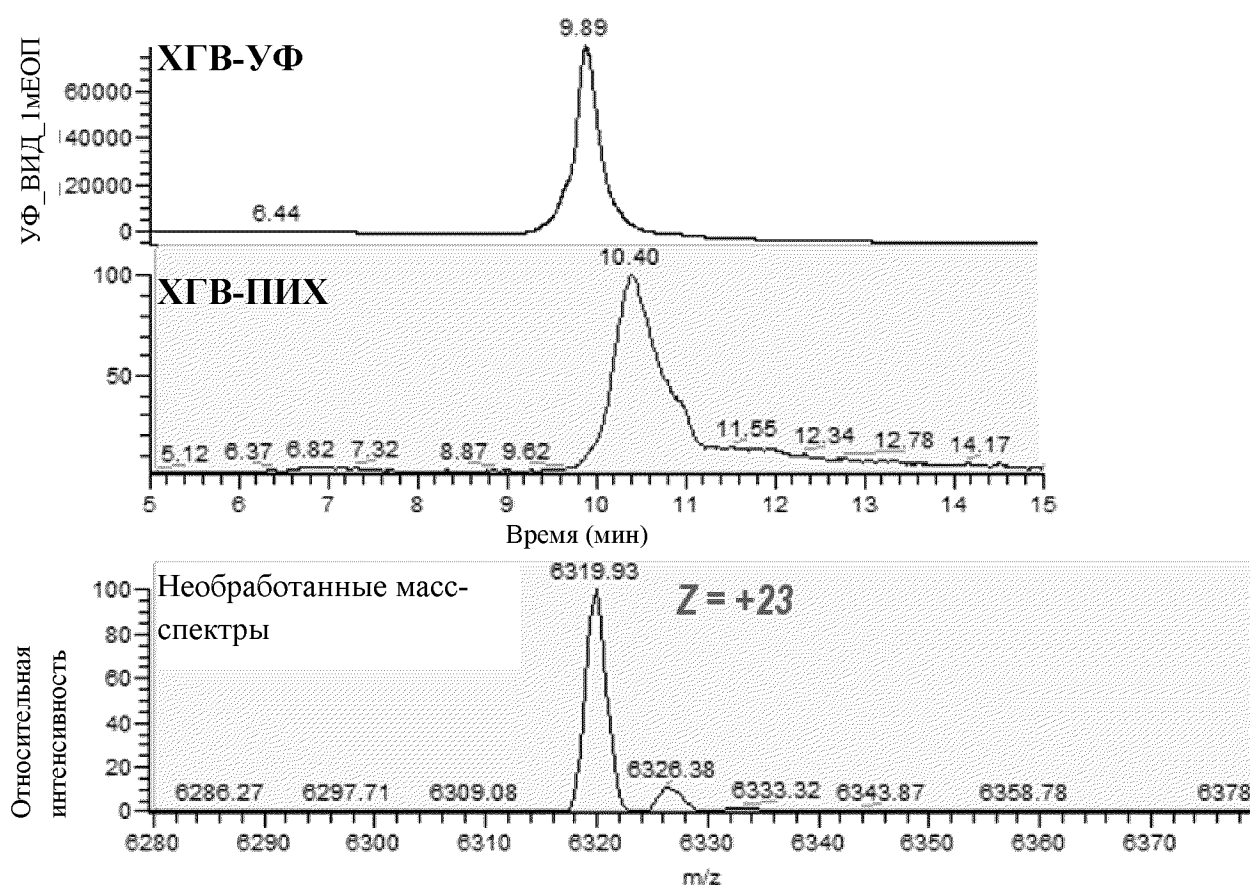
ФИГ. 5.



ФИГ. 6.

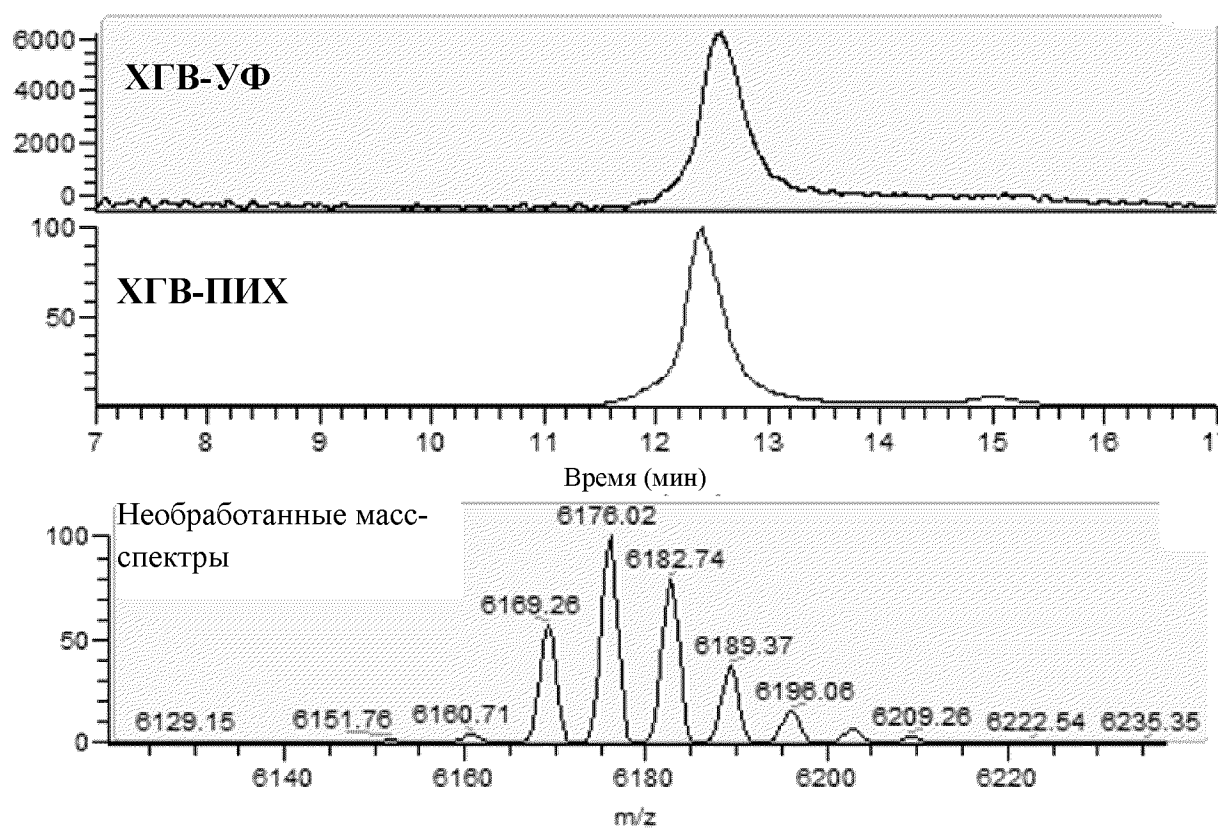


ФИГ. 7.



8/28

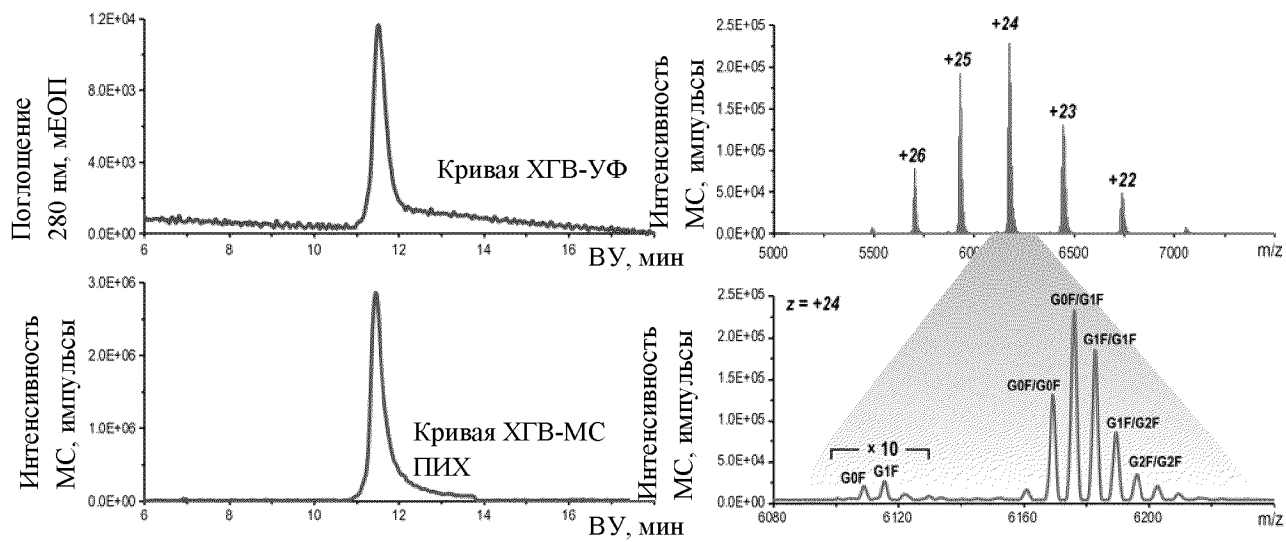
ФИГ. 8.



9/28

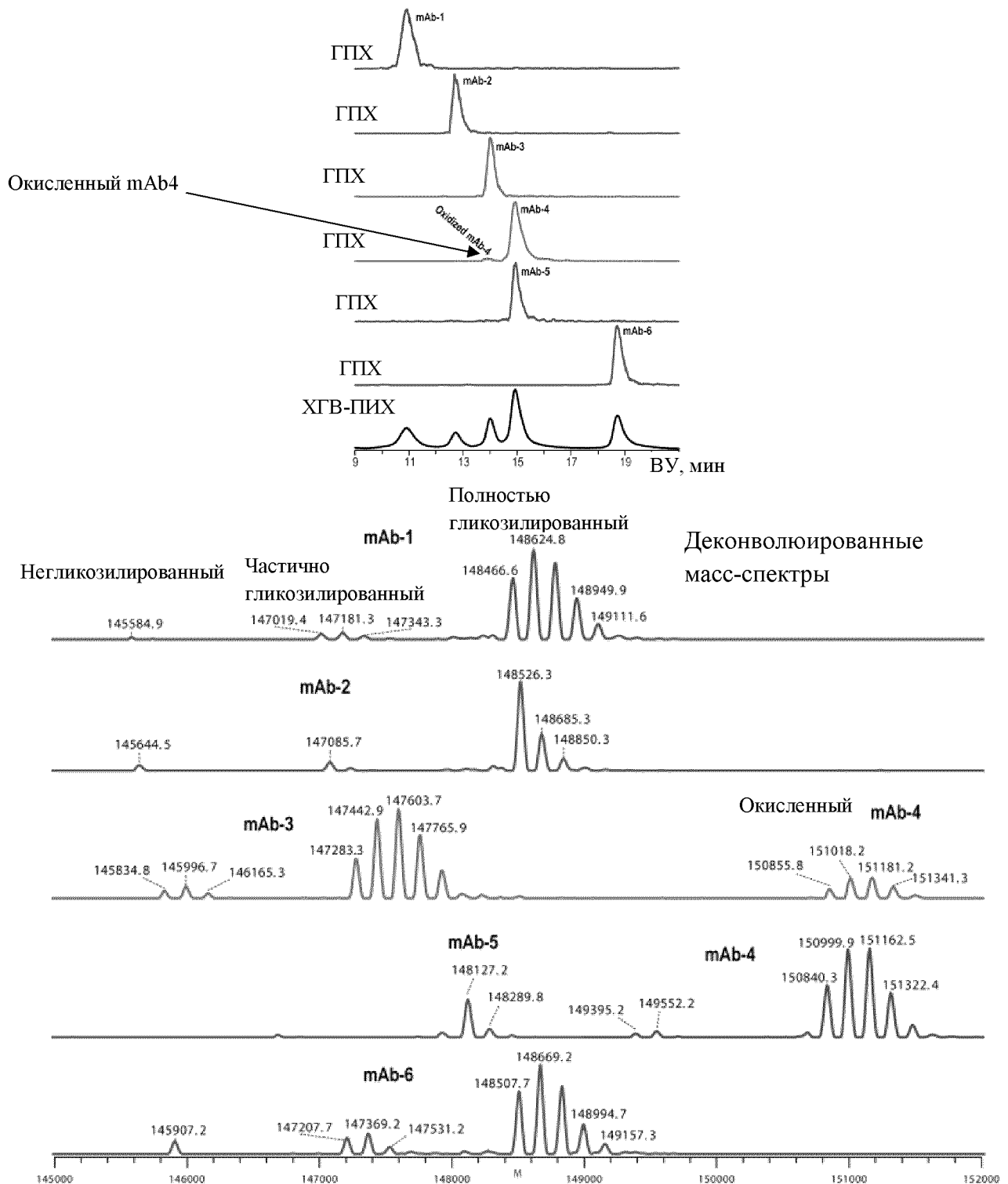
ФИГ. 9.

Анализ ХГВ-УФ/МС NISTmAb по схеме потоков С:



10/28

ФИГ. 10.

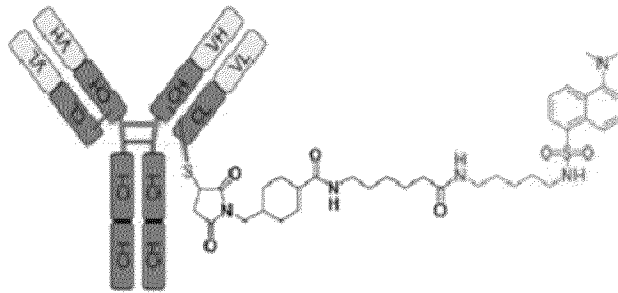


11/28

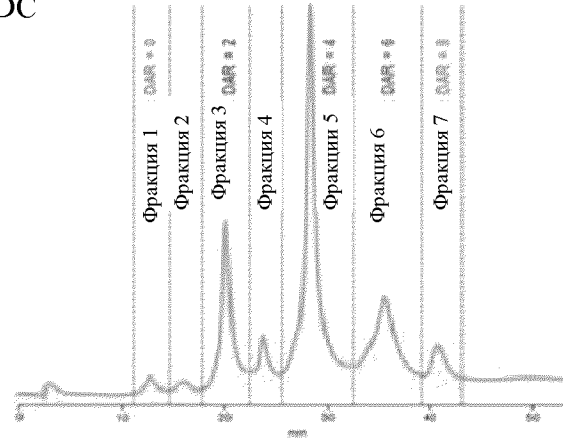
ФИГ. 11.

Профиль ХГВ от Sigma

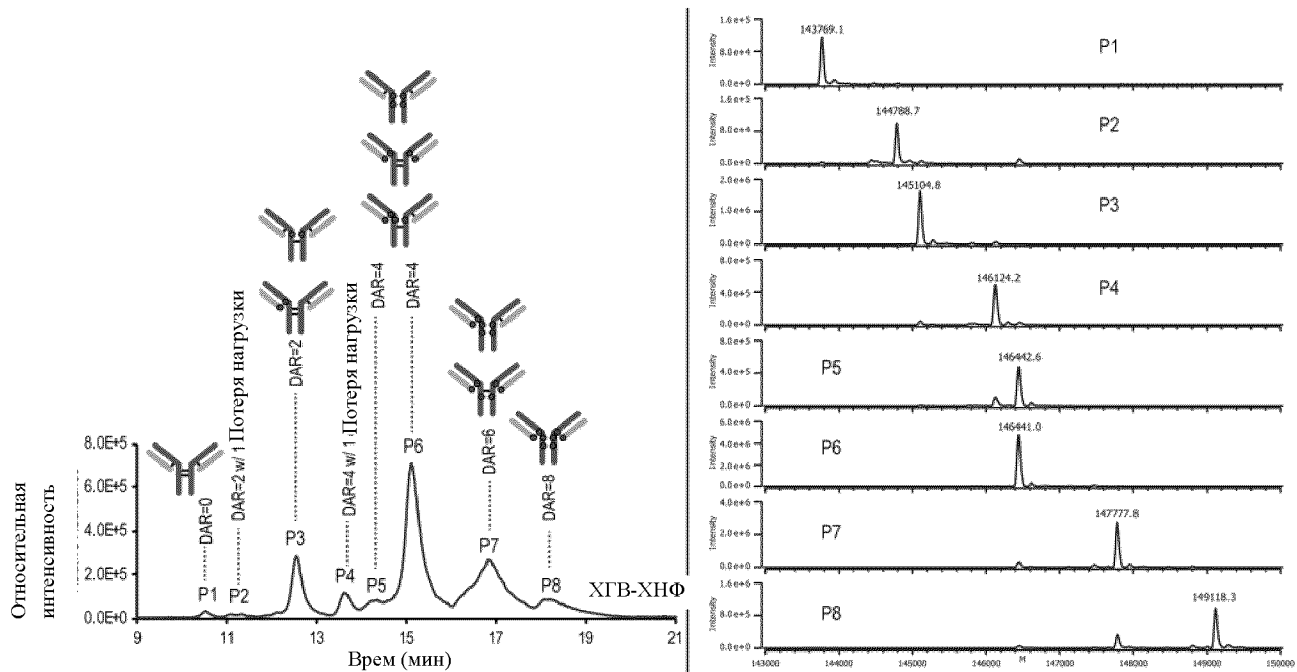
Имитация SigmaMAb Cys-связанного ADC



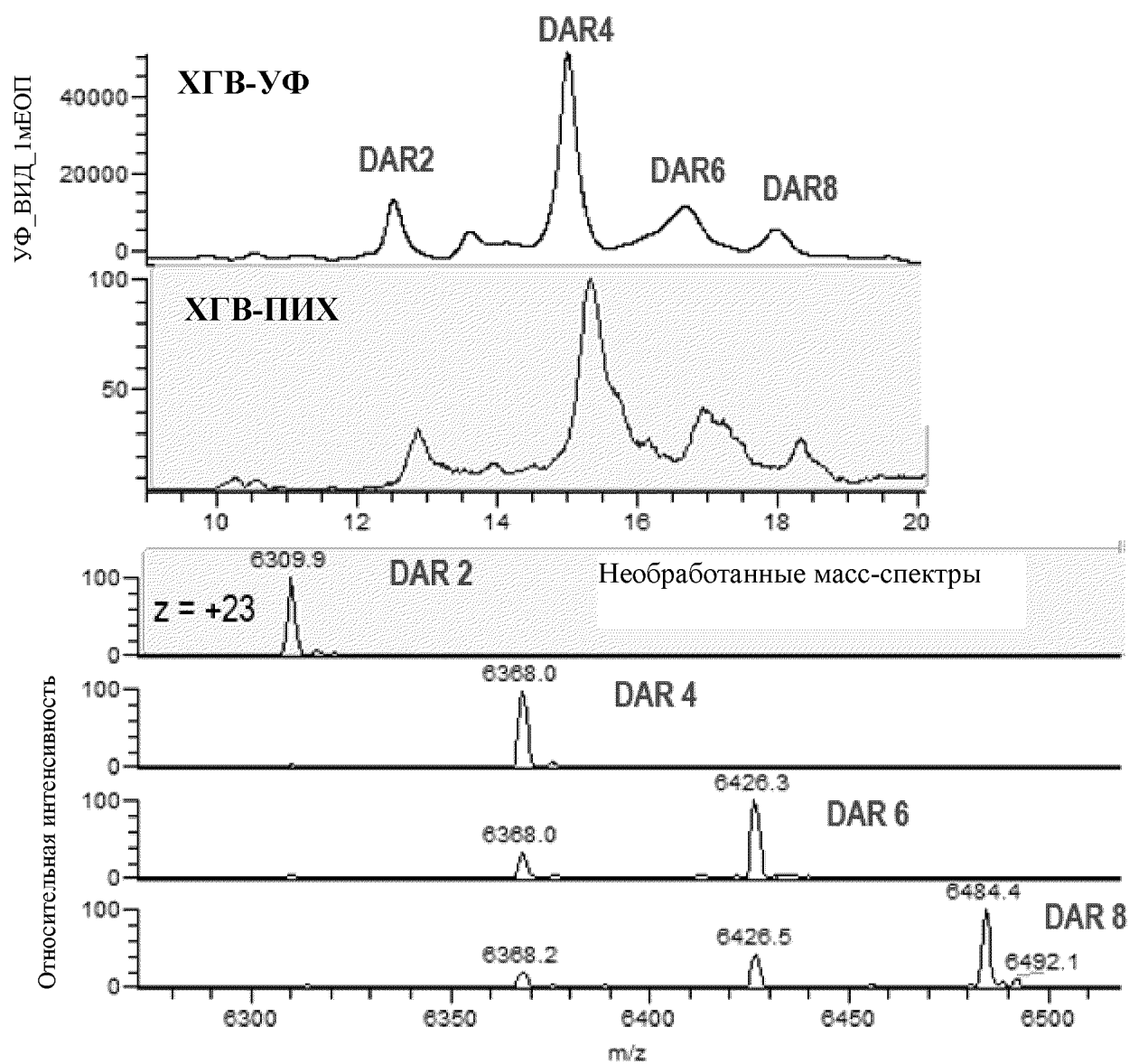
$\Delta\text{масс} = +668 \text{ Да}$



TSKgel Butyl-NPR 100 x 4.6 mm (Tosoh)
A: 50 mM PO4 pH 7.0, 1.5 M (NH₄)₂SO₄, 5% IPA
B: 50 mM PO4 pH 7.0, 20% IPA

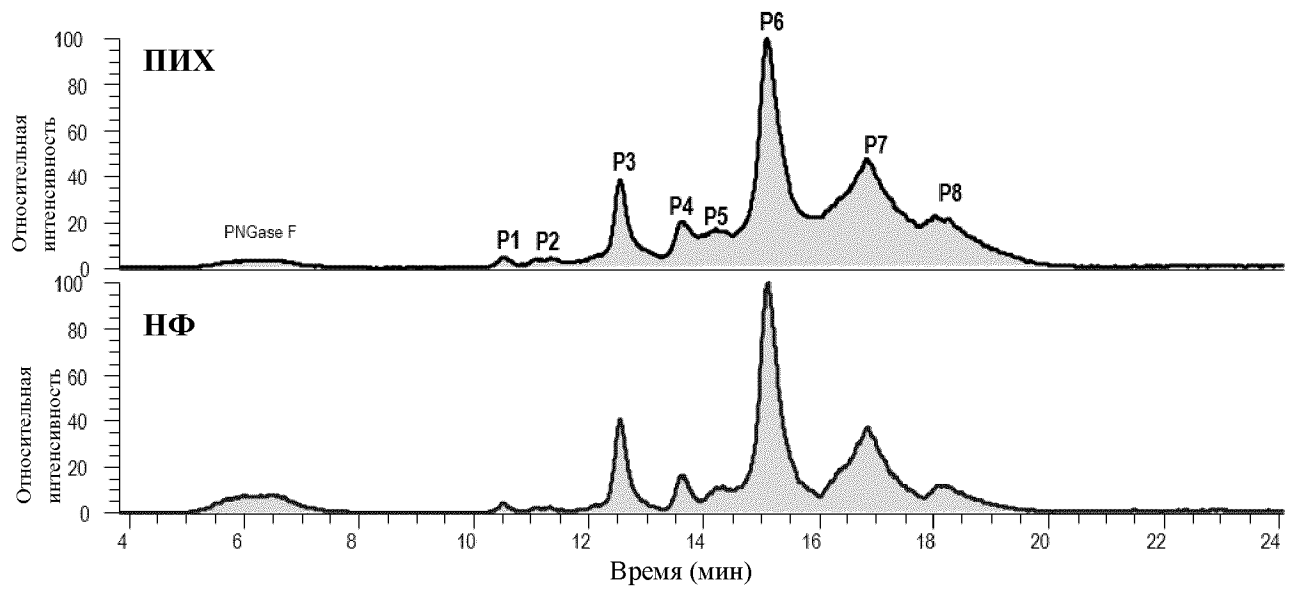


ФИГ. 12.

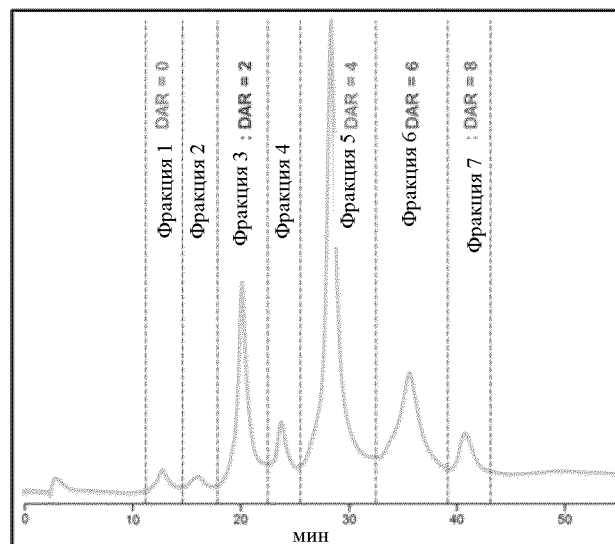


13/28

ФИГ. 13.

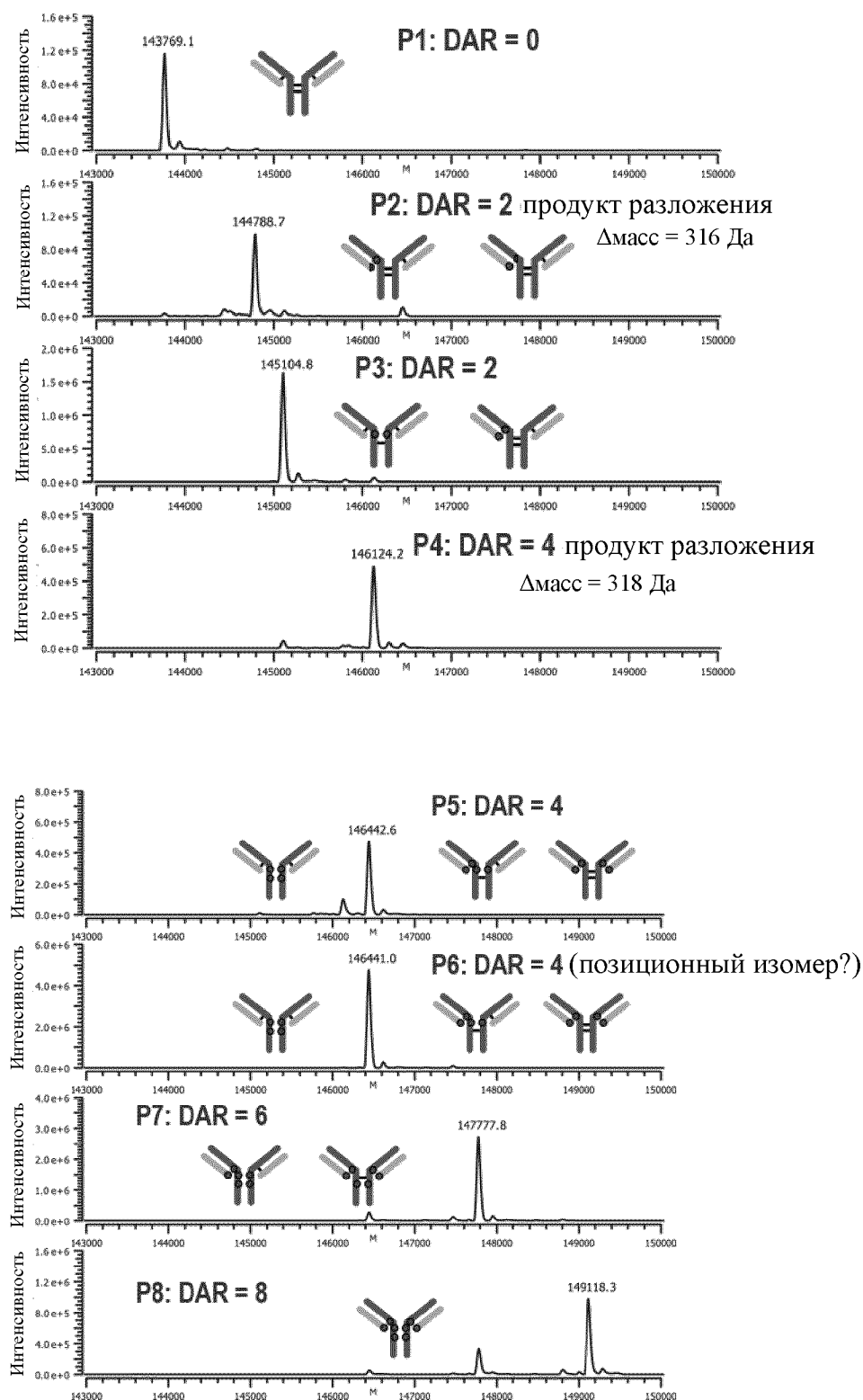


Профиль ХГВ от Sigma

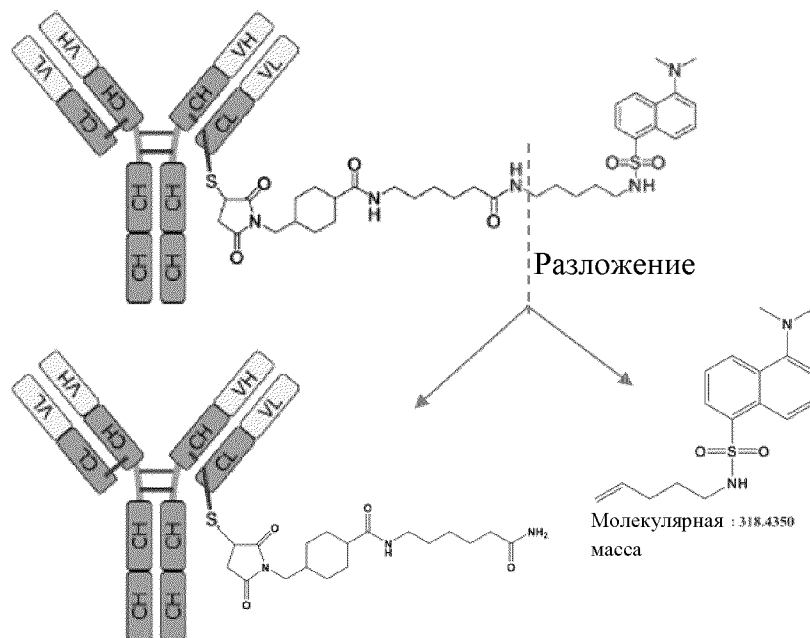
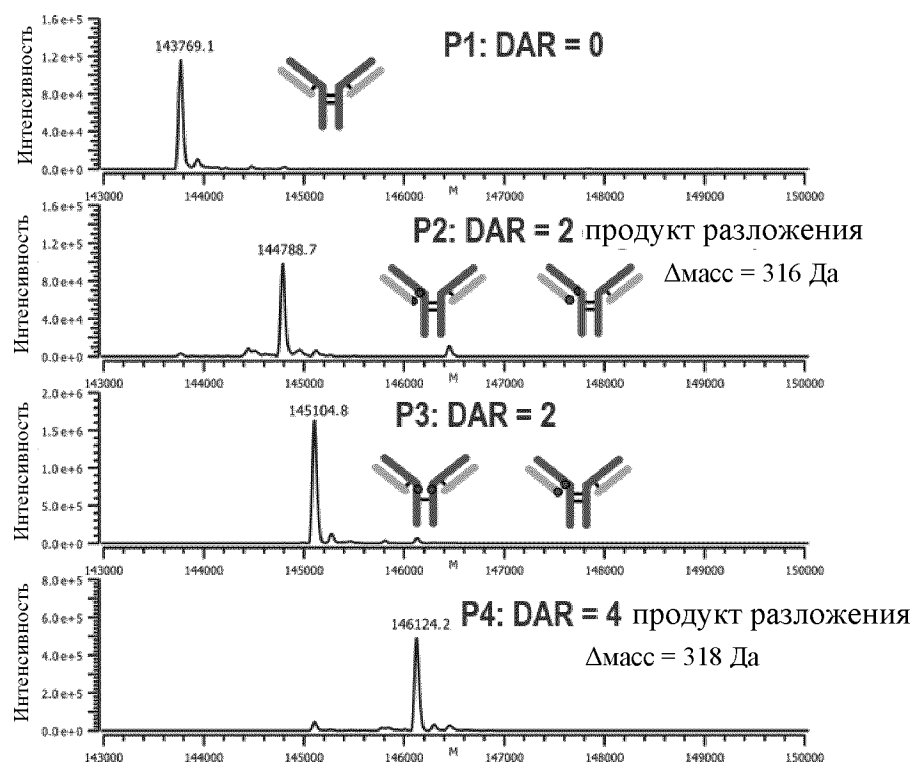


14/28

ФИГ. 14.

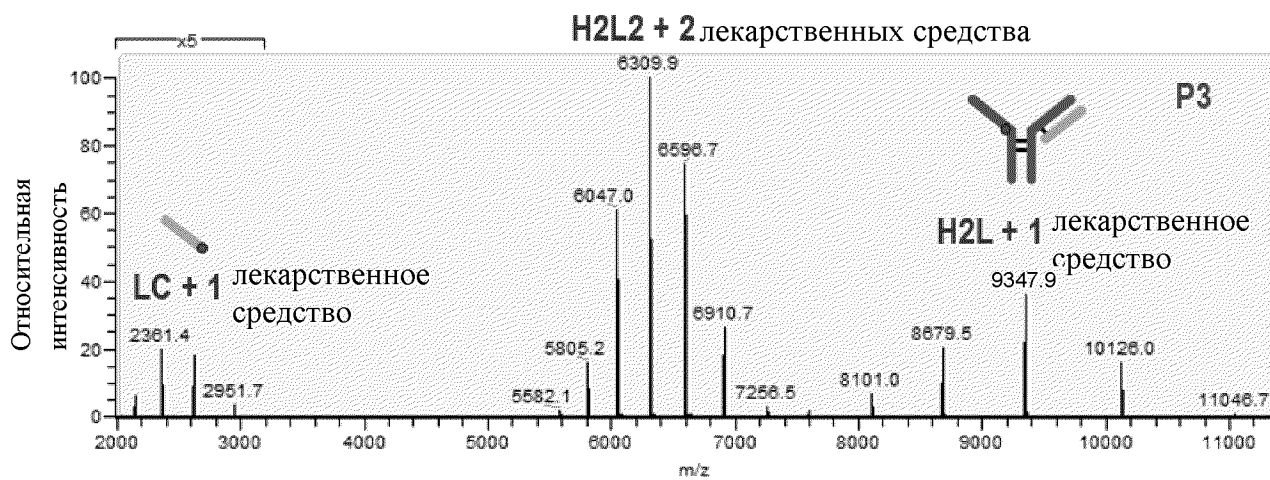
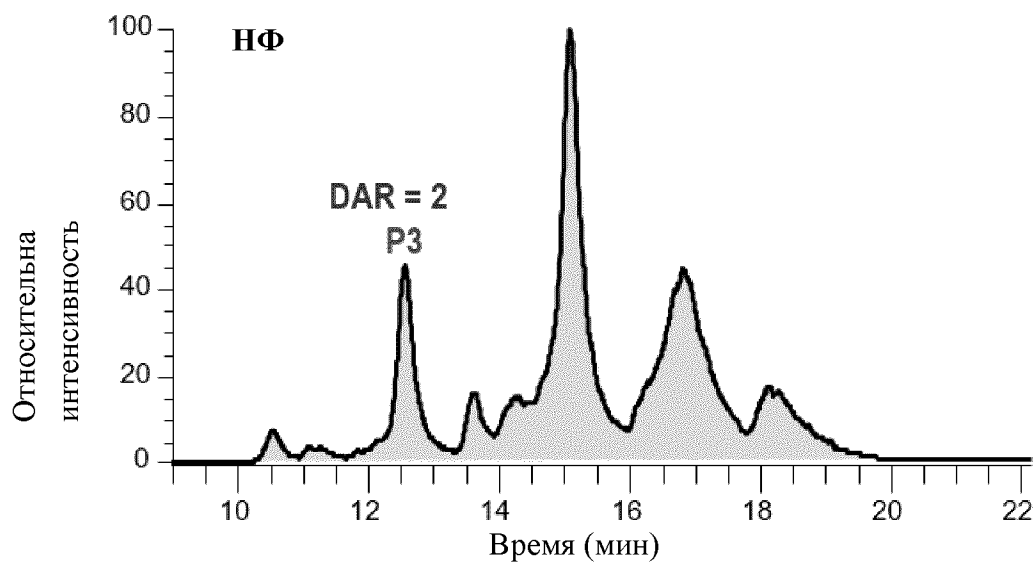


ФИГ. 15.

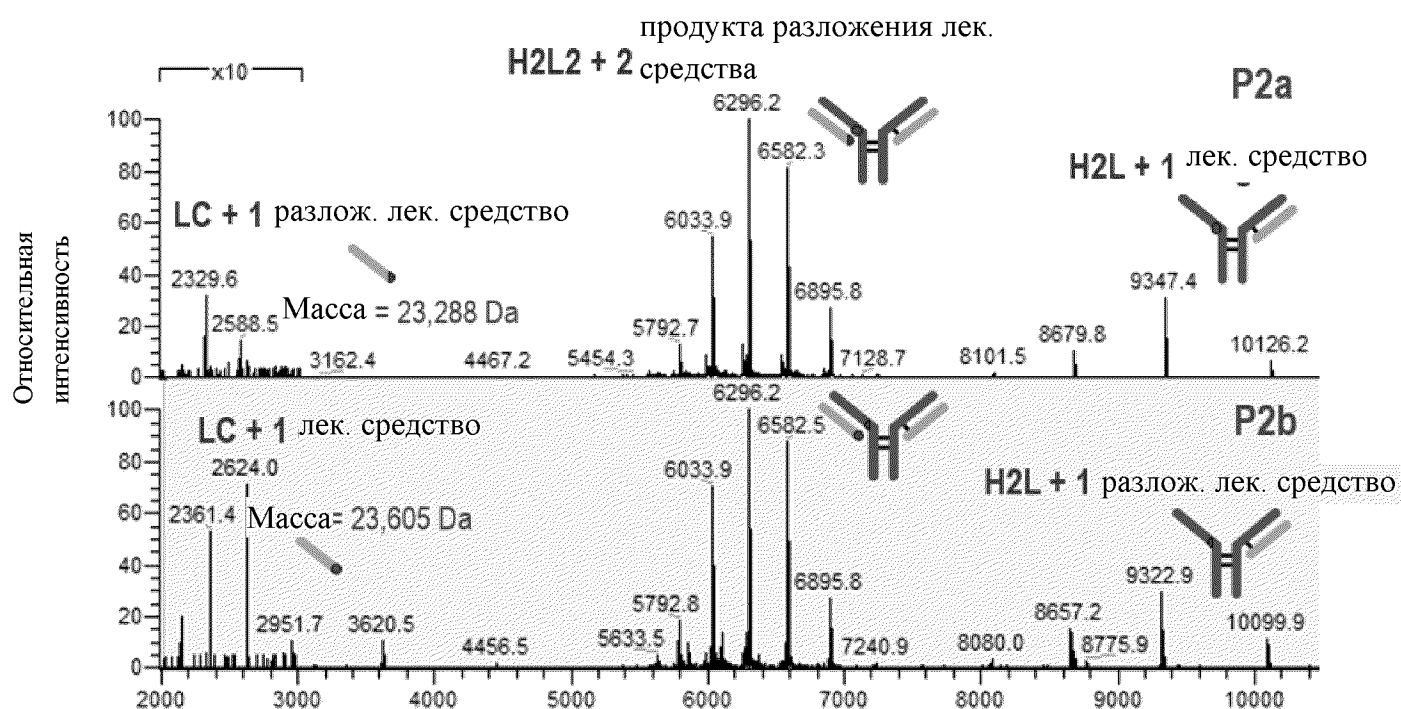
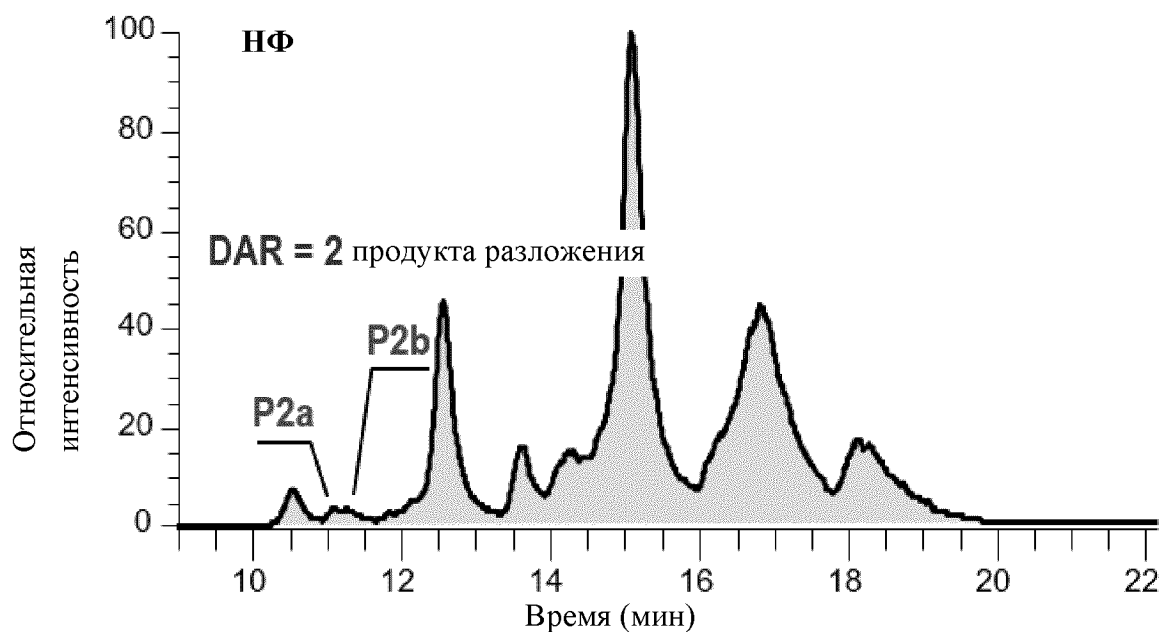


16/28

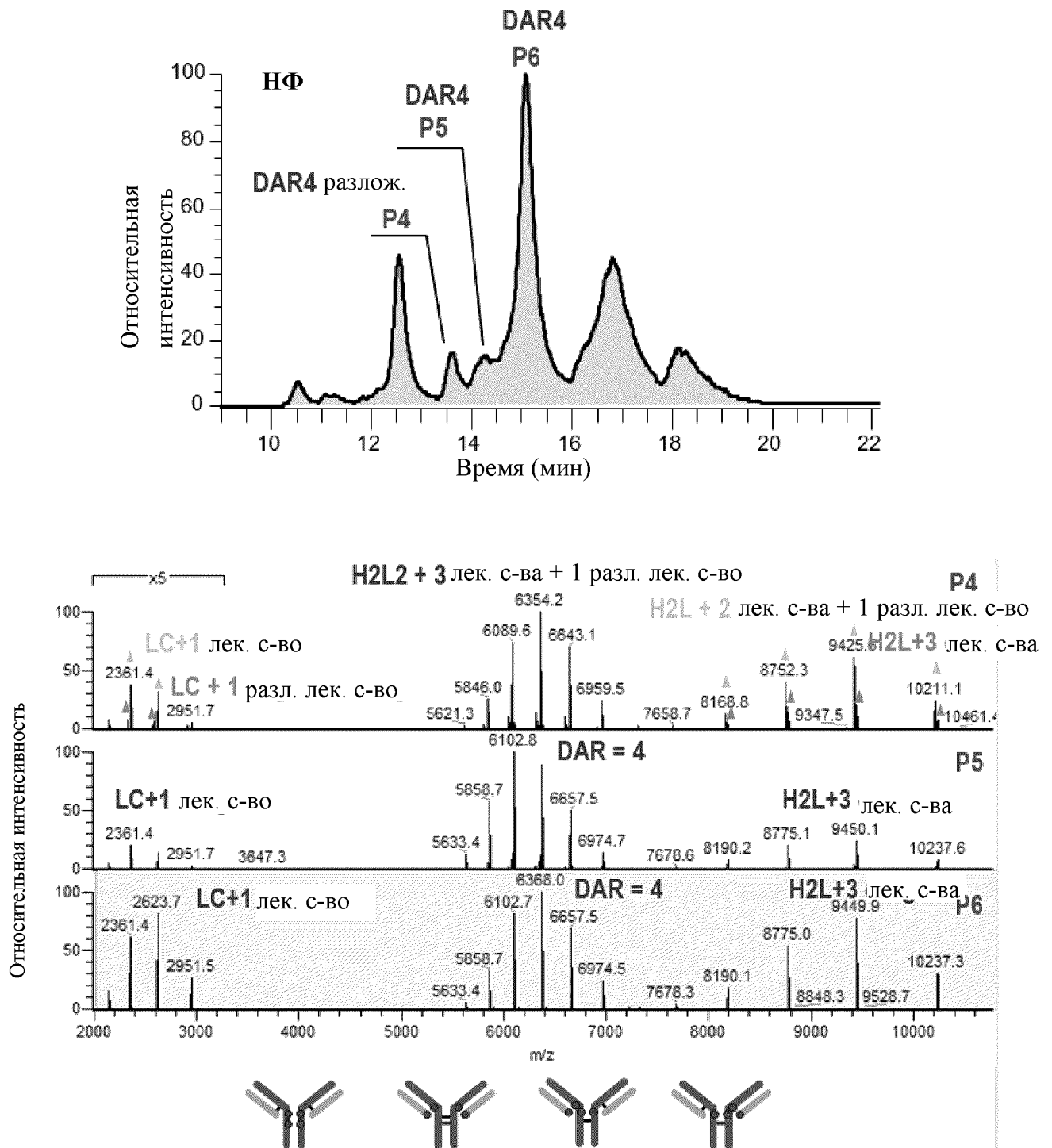
ФИГ. 16.



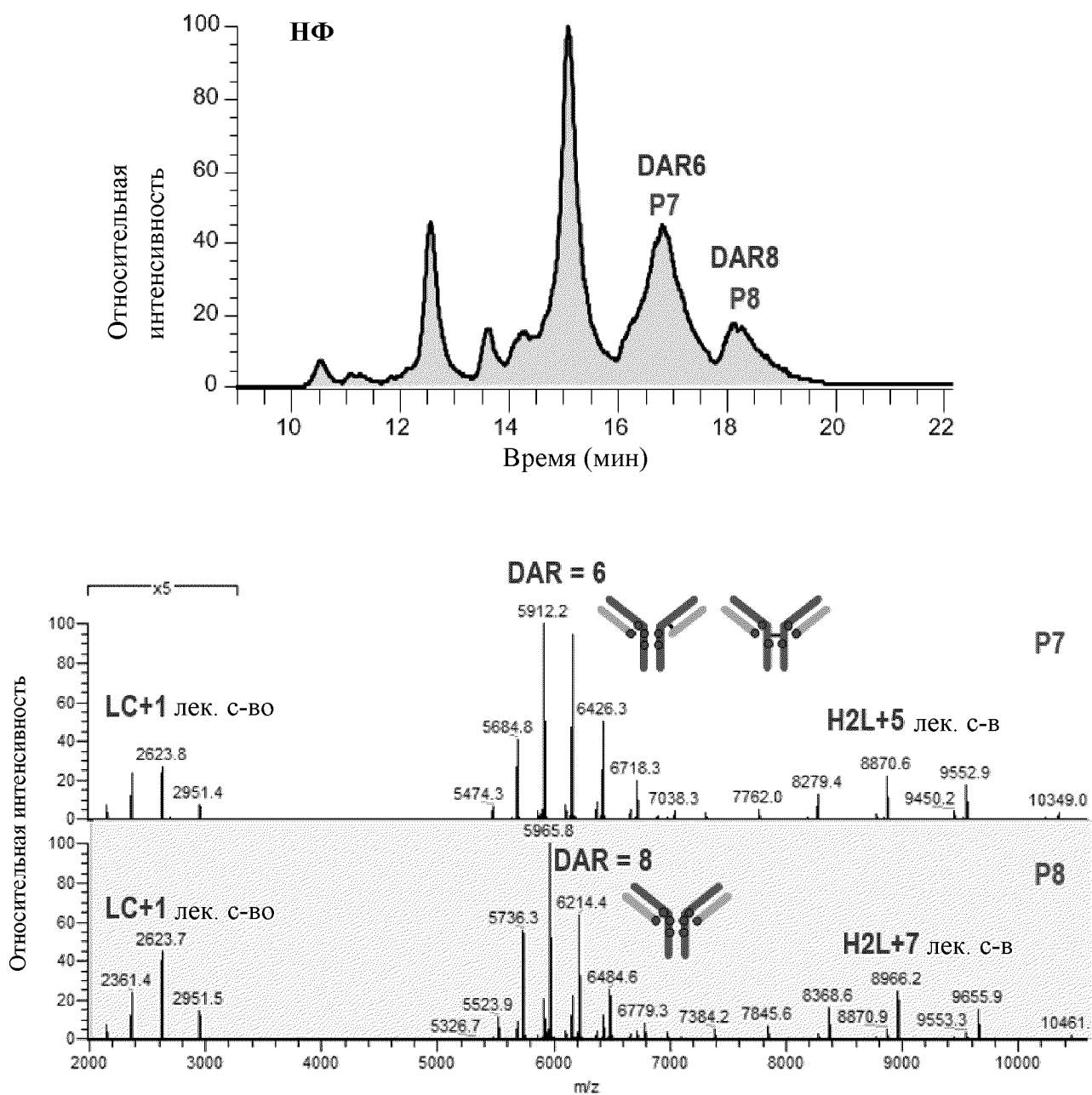
ФИГ. 17.



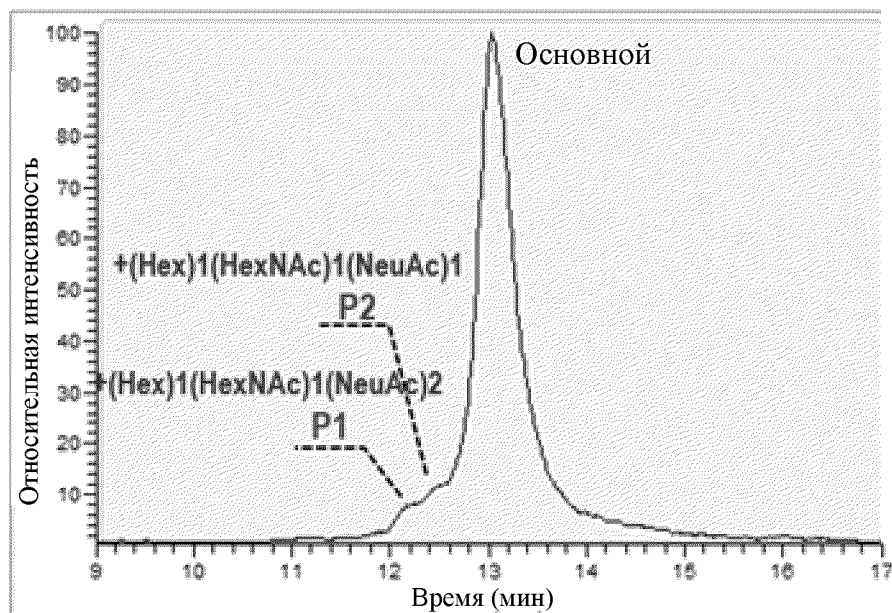
ФИГ. 18.



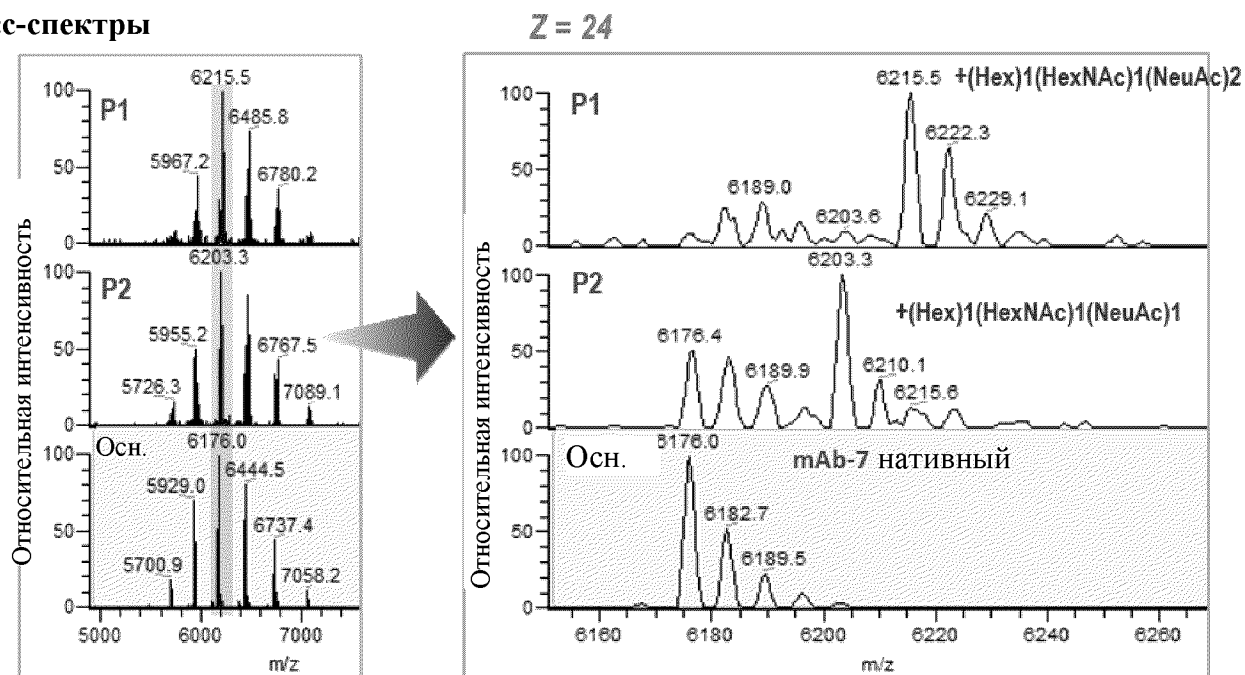
ФИГ. 19.



ФИГ. 20.

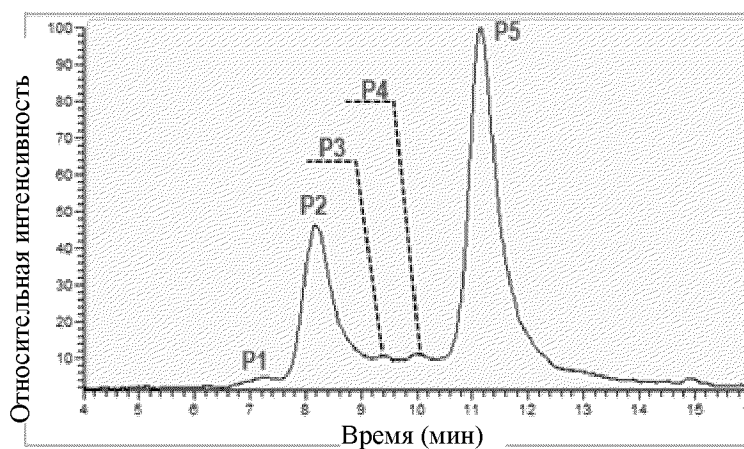


Необработанные
масс-спектры

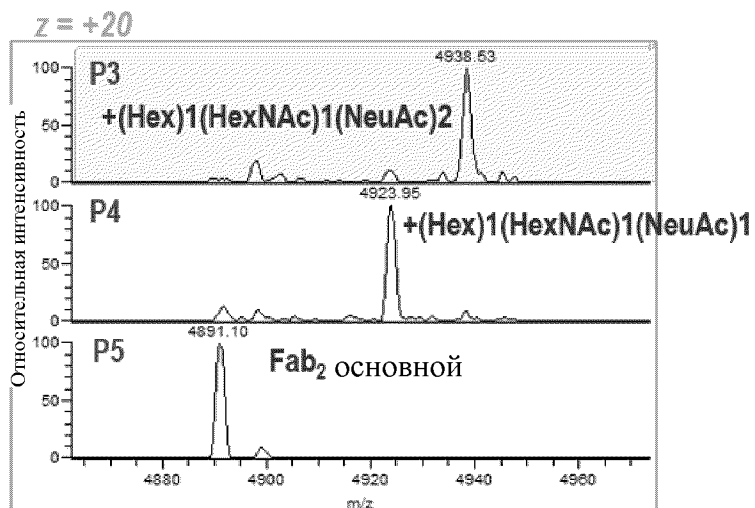
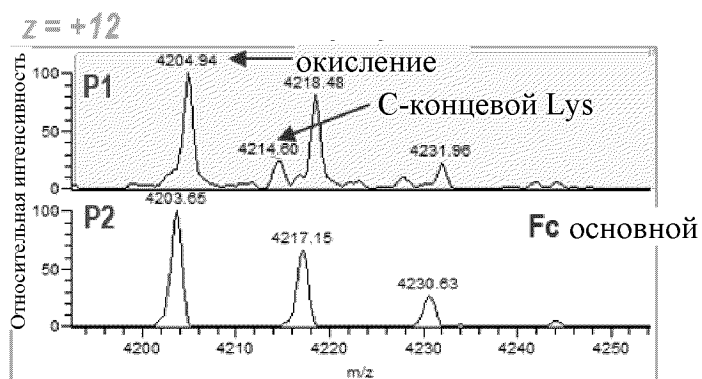
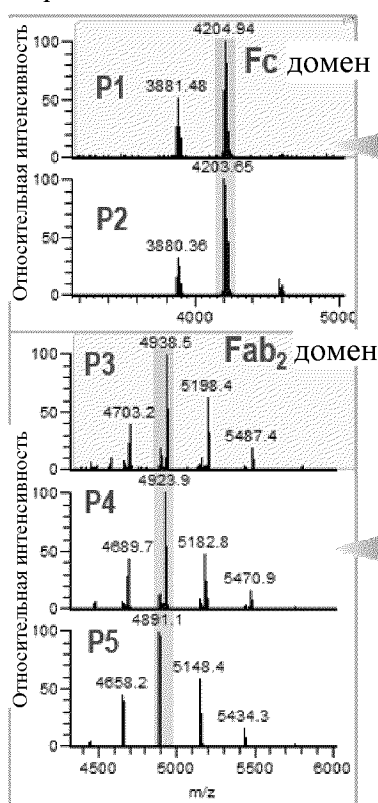


21/28

ФИГ. 21.

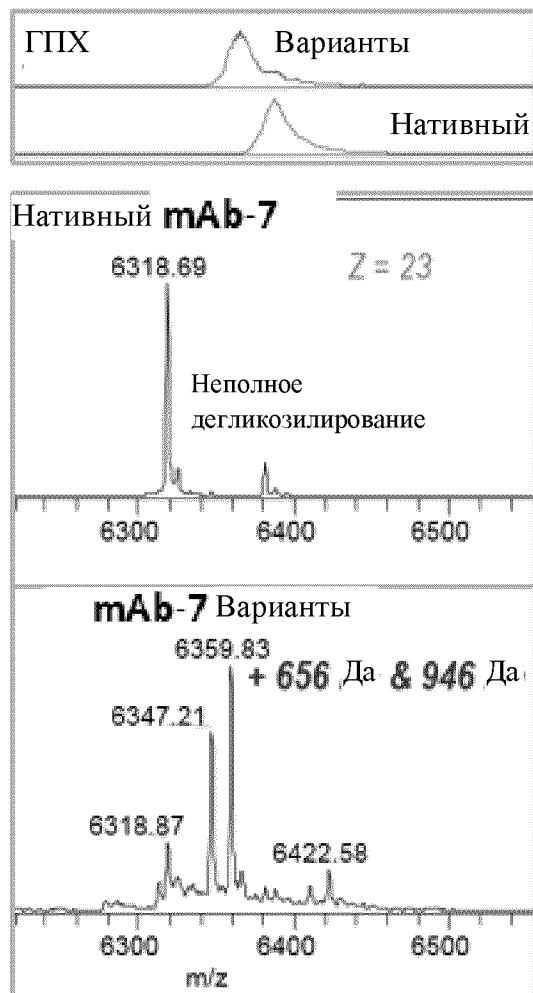


Необработанные масс-спектры



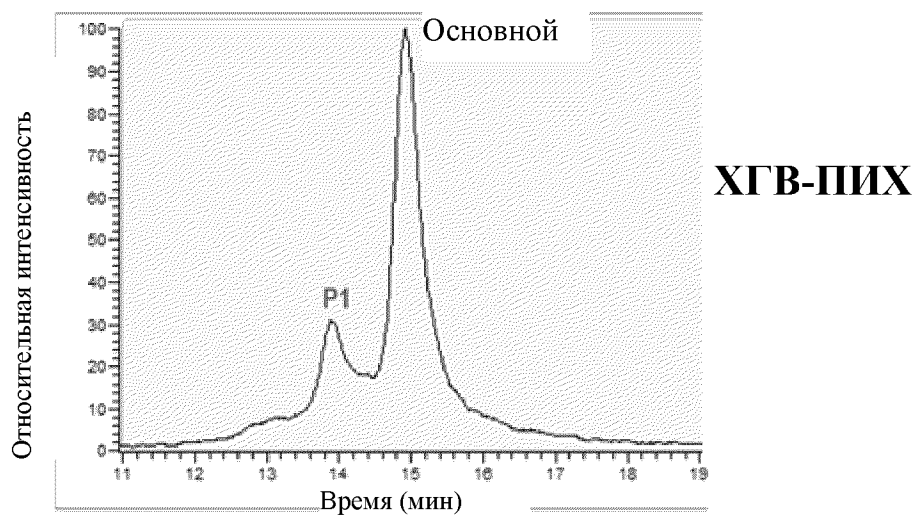
ФИГ. 22.

Нативная ГПХ-МС

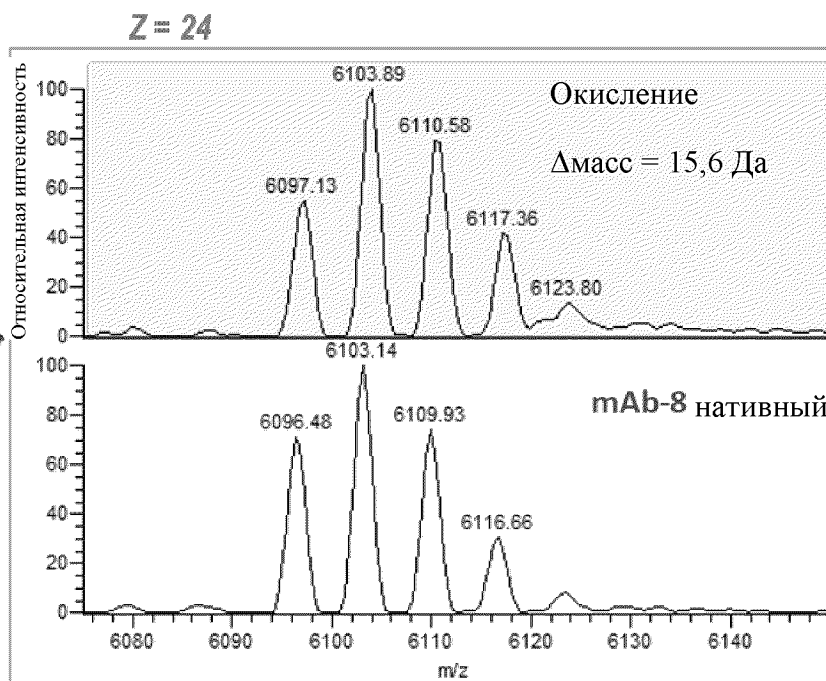
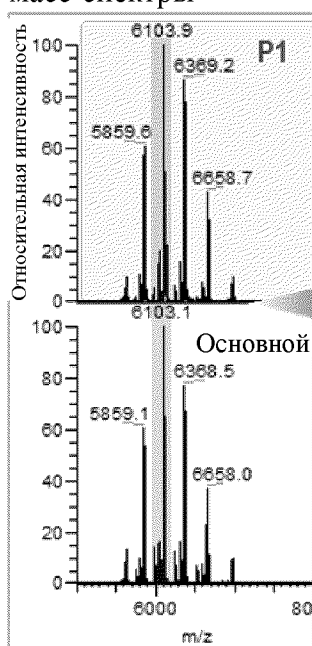


24/28

ФИГ. 24.



Необработанные
масс-спектры



ФИГ. 25.

mAb-8 Легкая цепь

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSI SFLNYYQQK GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS⁶⁰
 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTLTFGQG TRLEIKRTVA APSVFIFPPS¹²⁰
 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSTLT¹⁸⁰
 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC²¹³

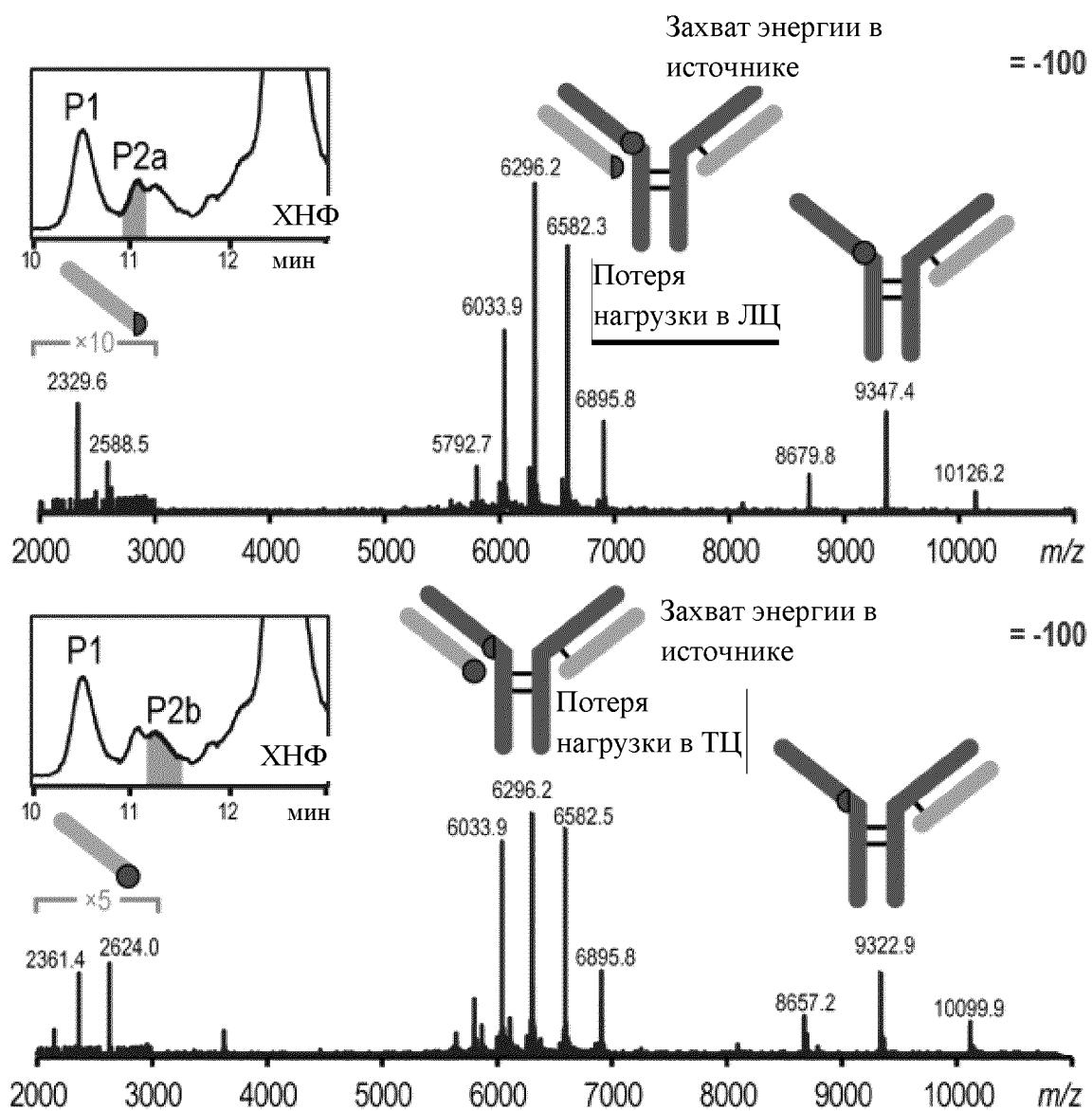
**mAb-8** Тяжелая цепь

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTSS SYAMNWRQA PGKGLEWVST ISGMGGSTYY⁶⁰
 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKRG YPHSFDIWGG GTMTVTVSSAS¹²⁰
 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL¹⁸⁰
 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS²⁴⁰
 VFLFPPPKPD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST³⁰⁰
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT³⁶⁰
 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ⁴²⁰
 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK⁴⁴⁸

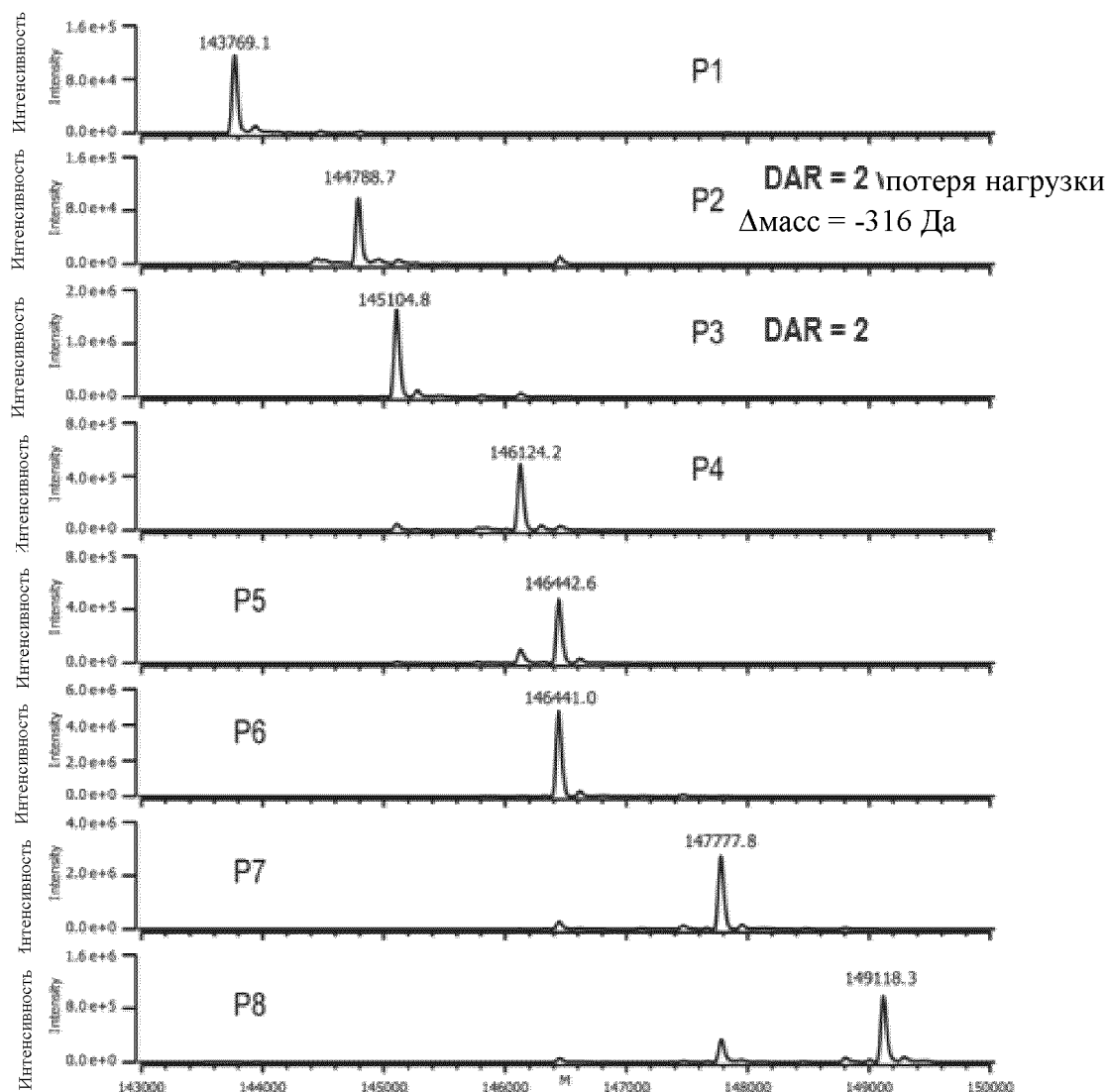
Таблица эталонного стандарта характеристики ПТМ

ПТМ и его местоположение	Лот А	Лот В
ТЦ С-концевой пептид Lys ⁴⁴⁸	1.4	1.5
Нет гликозирования в ТЦ Asn ²⁹⁸	10.0	12.8
Дезамидирование в ТЦ Asn ³¹⁵	<1.0	<1.0
Дезамидирование в ТЦ Asn ³⁸⁵	1.2	1.0
Окисление в ТЦ Met⁵⁴	13.6	10.5
Окисление в ТЦ Met ¹¹³	2.2	1.7
Окисление в ТЦ Met ²⁵³	4.3	3.1
N-концевое образование пироглутамата в ТЦ Glu ¹	2.1	1.8
Изомеризация в ТЦ Asp ²⁸¹	2.2	2.2
Изомеризация в ТЦ Asp ⁴⁰²	2.1	2.1

ФИГ. 26.



ФИГ. 27.



ФИГ. 28.

