

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **044298**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.08.14**

(21) Номер заявки  
**202091577**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.01.29**

(51) Int. Cl. **C07K 1/16** (2006.01)  
**A61K 47/64** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 19/00** (2006.01)  
**C07K 16/00** (2006.01)  
**A61K 31/191** (2006.01)

---

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

---

(31) **62/624,338**

(32) **2018.01.31**

(33) **US**

(43) **2020.10.26**

(86) **PCT/US2019/015549**

(87) **WO 2019/152356 2019.08.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Ванг Шунхай (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) WO-A1-2017120613  
DATABASE FlyBase [Online] "The  
modification of a protein by amino acid  
glucuronylation, the addition of a glucuronate group,  
the uronic acid derived from glucose", XP002792249,  
Database accession no. G0:0018321 (Gene Ontology),  
the whole document

---

(57) В изобретении предусмотрены композиции и способы для выявления глюкуронизированных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство.

---

**B1**

**044298**

**044298**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

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

#### Предпосылки изобретения

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

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

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

#### Краткое описание изобретения

Предусмотрены композиции и способы для выявления глюкуронизированных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления предусмотрен способ выявления глюкуронирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем дегликозилирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и обработки дегликозилированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью фермента, например FabRICATOR®, с получением одного фрагмента Fc\* (два идентичных фрагмента Fc/2, связанных вместе с помощью нековалентных взаимодействий) и одного Fab<sub>2</sub>. Затем фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют на кислотные фракции Fc\* и Fab<sub>2</sub>. В одном варианте осуществления фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> разделяют с применением ионообменной хроматографии, например хроматографии с сильной катионообменной средой. После разделения кислотные фракции собирают, высушивают и денатурируют. Высушенные и денатурированные кислотные фракции алкилируют и затем расщепляют с помощью трипсина с получением образца. Затем образец обрабатывают с помощью NaBH<sub>4</sub> с получением восстановленного образца. Образцы как восстановленного Fc\*, так и восстановленного Fab<sub>2</sub> затем подвергают анализу методом жидкостной хроматографии с обращенной фазой/масс-спектропии для выявления глюкуронирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления способ включает стадию сравнения результатов масс-спектропии восстановленного образца и невосстановленного образца для выявления различий по массе восстановленного и невосстановленного образцов. Продукт, представляющий собой белковое лекарственное средство, может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок. В одном варианте осуществления глюкуронирование определяют на остатках лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

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

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

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

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

#### **Краткое описание графических материалов**

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

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

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

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

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

Фиг. 6A представляет собой хроматограмму второго образца. Фиг. 6B представляет собой хроматограмму второго образца, обработанного глюкуроновой кислотой, на которой показано искусственное глюкуронилирование. На фиг. 6C показаны результаты спектров фрагментации M<sub>2</sub> для существовавшего ранее глюкуронилирования. На фиг. 6D показаны результаты спектров фрагментации M<sub>2</sub> для образцов, обработанных глюкуроновой кислотой.

Фиг. 7A представляет собой хроматограмму третьего образца. Фиг. 7B представляет собой хроматограмму третьего образца, обработанного глюкуроновой кислотой, на которой показано искусственное глюкуронилирование. На фиг. 7C показаны результаты спектров фрагментации M<sub>2</sub> для существовавшего ранее глюкуронилирования. На фиг. 7D показаны результаты спектров фрагментации M<sub>2</sub> для образцов, обработанных глюкуроновой кислотой.

#### **Подробное описание изобретения**

##### **I. Определения.**

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

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело (mAb)" относится к антителу, которое получено с помощью идентичных иммунных клеток, которые являются клонами уникальной родительской клетки, которая специфически связывает целевое вещество. mAb становятся все более по-

пулярными в качестве терапевтических средств для лечения различных заболеваний, включая без ограничения виды рака, артрит, астму, колит, аутоиммунные заболевания и инфекции. mAb представляют собой крупные белки со значениями молекулярной массы примерно 150 кДа, и при этом они составлены из двух идентичных тяжелых цепей (HC) по ~50 кДа и двух идентичных легких цепей (LC) по ~25 кДа. Они также содержат по меньшей мере 16 дисульфидных связей, которые поддерживают трехмерную структуру и биологическую активность. Несмотря на то, что они имеют сходные вторичные белковые структуры, разные mAb сильно различаются по последовательности вариабельных областей, особенно в областях, определяющих комплементарность (CDR), которые ответственны за разнообразие и специфичность связывания антитело-антиген.

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

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

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

Используемый в данном документе термин "посттрансляционная модификация (PTM)" относится к биохимическим модификациям, которые происходят с одной или более аминокислотами в белке после биосинтеза белка. PTM играет важную роль в клеточной функции посредством регуляции фолдинга белков, нацеливания белков на специфические клеточные компартменты или посредством регуляции взаимодействия между лигандами и другими белками. Наиболее распространенные модификации представляют собой специфическое расщепление белков-предшественников; образование дисульфидных связей; или ковалентное добавление или удаление низкомолекулярных групп, что приводит к таким модификациям, как ацетилирование, амидирование, биотинилирование, цистеинилирование, деамидирование, фарнезилирование, формилирование, геранилирование, глутатионилирование, гликирование (конъюгация с углеводами без участия ферментов), гликозилирование (ферментативная конъюгация с углеводами), гидроксильное метилирование, моно-ADP-рибозилирование, миристоилирование, окисление, пальмитоилирование, фосфорилирование, поли-ADP-рибозилирование, стеароилирование или сульфатирование. Убиквитинилирование является еще одной распространенной PTM, которая важна в путях разложения белков. Некоторые PTM обратимы под действием деконъюгирующих ферментов.

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

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

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

## II. Способы выявления гликоурирования и способы его применения.

### A. Идентификация гликоурирования.

Предусмотрены композиции и способы для выявления гликоурированных продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство. В примерах 1-3 представлено подробное описание способов, которые применяют для обнаружения и выявления гликоурированных аминокислот в терапевтических белках. Как правило, один способ выявления гликоурирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, включает дегликозилирование продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и обработку дегликозилированного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с помощью FabRICATOR® с получением одного фрагмента Fc\* (два идентичных фрагмента Fc/2, связанных вместе с помощью нековалентных взаимодействий) и одного фрагмента Fab<sub>2</sub>. В одном варианте осуществления фрагменты Fc\* и Fab<sub>2</sub> получают с применением рекомбинантного фермента IdeS из *Streptococcus pyogenes*, продаваемого под названием FabRICATOR®.

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

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

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

Затем расщепленную трипсином кислотную фракцию инкубируют с 50 mM NaBH<sub>4</sub> при 37°C в течение 1 ч перед гашением 10% муравьиной кислотой (FA) с получением восстановленного образца. Восстановленный образец затем подвергают анализу методом жидкостной хроматографии с обращенной фазой/масс-спектропии для выявления гликоурирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. В одном варианте осуществления способ включает стадию сравнения результатов масс-спектропии восстановленного образца и невосстановленного образца для выявления различий по массе восстановленного и невосстановленного образцов. Продукт, представляющий собой лекарственное средство, может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок. В одном варианте осуществления гликоурирование определяют на остатках лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

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

Раскрытые способы можно применять для контроля чистоты продуктов, представляющих собой белковое лекарственное средство, например моноклональных антител или других терапевтических белков. В одном варианте осуществления предусмотрен способ повышения чистоты продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, путем осуществления анализа продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, для выявления гликоурирования первичной аминогруппы одной или более аминокислот продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, и удаления гликоурированных белков из продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство, с получением очищенного продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство. Гликоурирование можно обнаружить с применением способов, описанных выше и в примерах. В одном варианте осуществления гликоурированные белки удаляют с помощью методик высокоэффективной жидкостной хроматографии, необязательно в сочетании с масс-спектропией.

Иллюстративные методики хроматографии включают без ограничения эксклюзионную хроматографию, ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, сверхэффективную жидкостную хроматографию и их комбинации. Как правило, глюкуронилирование имеет место по остатку лизина продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

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

С. Продукты, представляющие собой белковое лекарственное средство.

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

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

### Примеры

Пример 1. Идентификация модификаций на интактном уровне антител.

Способы.

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

Результаты.

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

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

Способы.

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

Результаты.

Эта обработка привела к получению одного фрагмента Fab2 и двух идентичных фрагментов Fc/2, которые связаны друг с другом посредством нековалентных связей (Fc\*). Аликвоту продукта расщепления подвергали анализу IEX-MS, происходящему в реальном времени, как описано выше. Как и ожидалось, одинаковый кислотный вариант с увеличением массы на ~176 Да обнаружили в кислотных пиках как Fab2, так и Fc\* (фиг. 1A-1P).

Пример 3. Идентификация и подтверждение новой кислотной модификации.

Способы.

Чтобы дополнительно идентифицировать сайты модификации аминокислотных остатков и получить точную массу этой неизвестной модификации, кислотные фракции фрагментов Fc\* и Fab2 собирали из колонки SCX для анализа методом пептидного картирования. Собранные кислотные фракции сначала высушивали в SpeedVac, а затем денатурировали и восстанавливали в 20 мкл раствора, содержащего 5 мМ дитиотрептола (DTT), 8 М мочевины и 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), посредством нагревания при 50°C течение 30 мин. Образцы затем алкилировали с помощью 10 мМ йодацетамида (IAA) посредством инкубирования при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Восстановленные и алкилированные образцы затем разбавляли с помощью 175 мкл 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и расщепляли с помощью трипсина при соотношении фермента к субстрату 1:10 (вес/вес) при 37°C в течение 4 ч. Расщепление оста-

навливали путем добавления 4 мкл 10% FA. Аликвоты каждого образца расщепленного белка затем разделяли с помощью RP-UPLC с последующим анализом MS, происходящим в реальном времени. Эксперименты MS и MS/MS проводили на системе Thermo Q Exactive Plus MS с высокоэнергетичной столкновительной диссоциацией (HCD), применяемой для фрагментации пептидов во время экспериментов MS/MS. Затем в файлах исходных данных MS проводился поиск по базе данных, содержащей последовательность mAb и переменную безразличную модификацию массой от 170 до 180 Да.

Результаты.

Результаты показали, что эта неизвестная модификация характеризовалась моноизотопной массой +176,03 Да и имела место при низких уровнях нескольких остатков Lys в последовательности mAb (фиг. 2). Основываясь на точной дельта-массе, эта модификация предположительно имела тот же элементный состав ( $C_6H_8O_6$ ), что и продукт глюкуронирования, которое, однако, как сообщалось, происходит на остатках Ser и Thr посредством O-связи, катализируемой UDP-глюкуронозилтрансферазой.

Расщепленную трипсином кислотную фракцию инкубировали с 50 mM  $NaBH_4$  при 37°C в течение 1 ч перед гашением 10% муравьиной кислотой (FA). Образец, обработанный с помощью  $NaBH_4$ , затем подвергли анализу методом RP LC/MS. Результат показал, что эта модификация (+176 Да) может быть восстановлена (+178 Да) с помощью  $NaBH_4$ , что указывает на присутствие структуры основания Шиффа в данной модификации (фиг. 3A, 3B).

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

Последующее расщепление трипсином и анализ методом пептидного картирования показали, что ряд глюкуронированных пептидов, присутствующих в гораздо большем количестве в образцах с искусственной модификацией, демонстрирует такие же точные массы, спектры фрагментации MS2 и значения времени удерживания, как и такие в необработанном образце (фиг. 4A-4E, 5A-5D, 6A-6D и 7A-7D).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

дегликозилирование продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство;

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

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

высушивание и денатурирование кислотных фракций;

алкилирование кислотных фракций;

расщепление кислотных фракций с помощью трипсина с получением невосстановленного образца;

инкубирование части невосстановленного образца с  $NaBH_4$  с получением восстановленного образца;

подвержение восстановленного образца анализу методом жидкостной хроматографии с обращенной фазой/масс-спектрологии для выявления глюкуронирования продукта, представляющего собой белковое лекарственное средство.

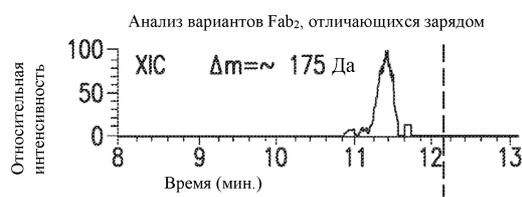
2. Способ по п.1, дополнительно включающий стадию сравнения результатов анализа методом масс-спектрологии для восстановленного образца и невосстановленного образца для выявления различий по массе между восстановленным образцом и невосстановленными образцами.

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

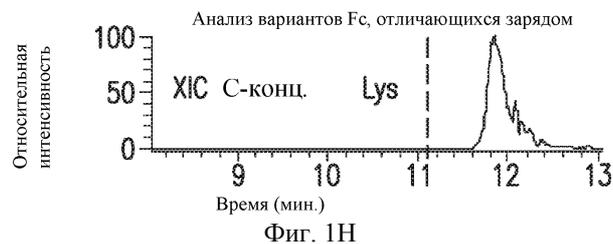
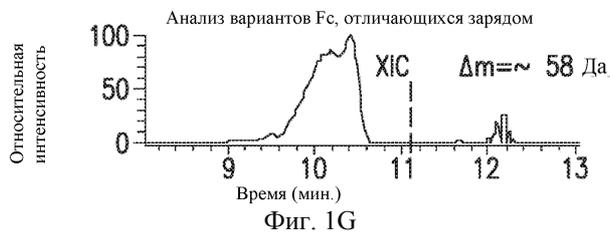
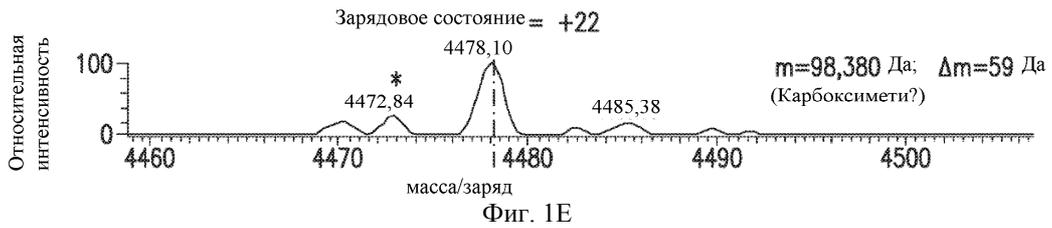
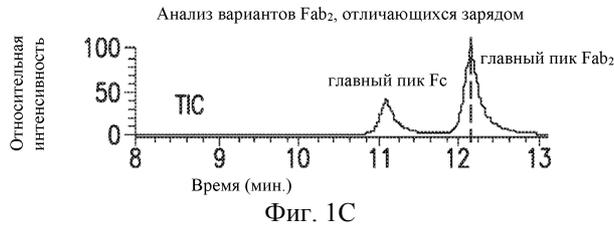
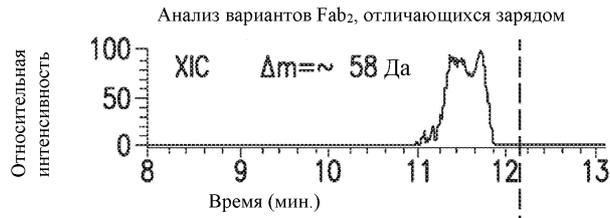
4. Способ по любому из пп.1-3, где фрагменты  $Fc^*$  и  $Fab_2$  получают с применением рекомбинантно модифицированной формы IdeS из *Streptococcus pyogenes*.

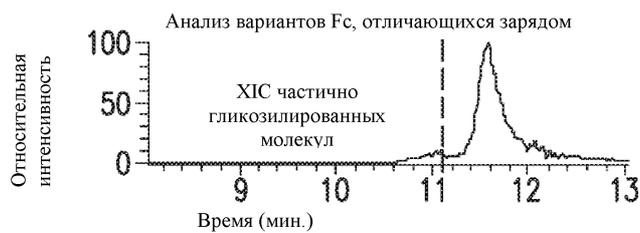
5. Способ по любому из пп.1-4, где ионообменная хроматография представляет собой хроматографию с сильной катионообменной средой.

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



Фиг. 1А

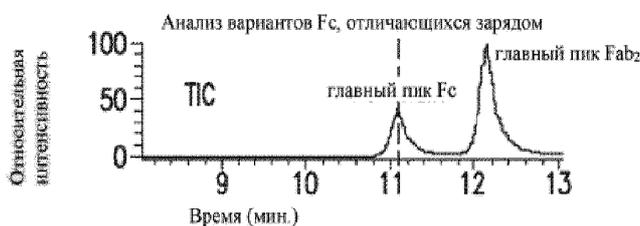




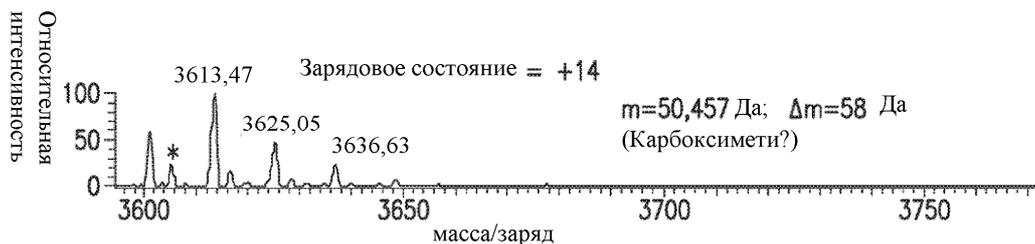
Фиг. 1I



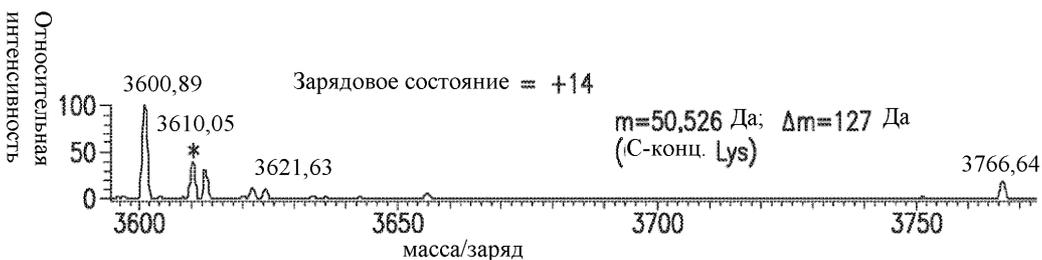
Фиг. 1J



Фиг. 1K



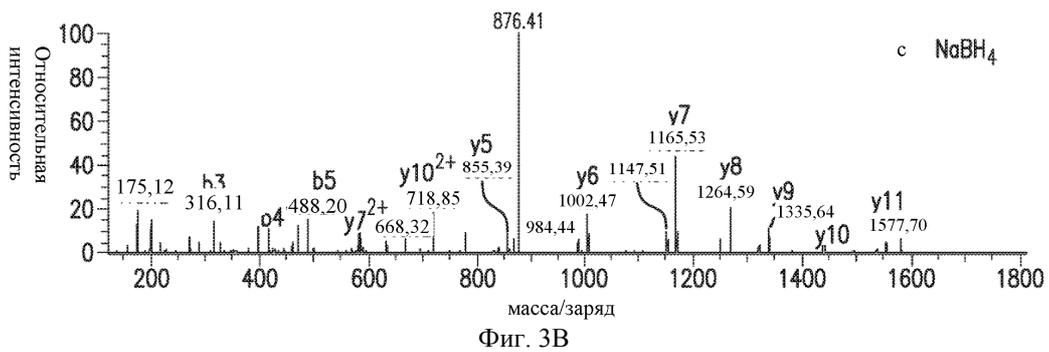
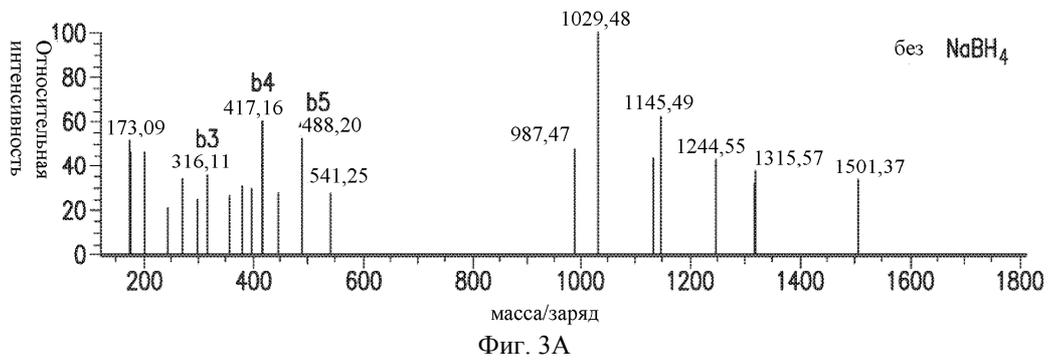
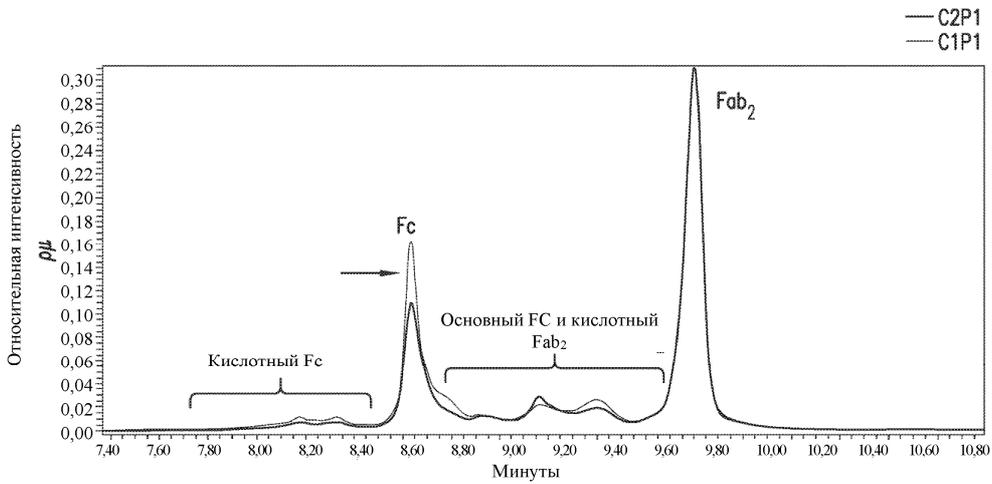
Фиг. 1L

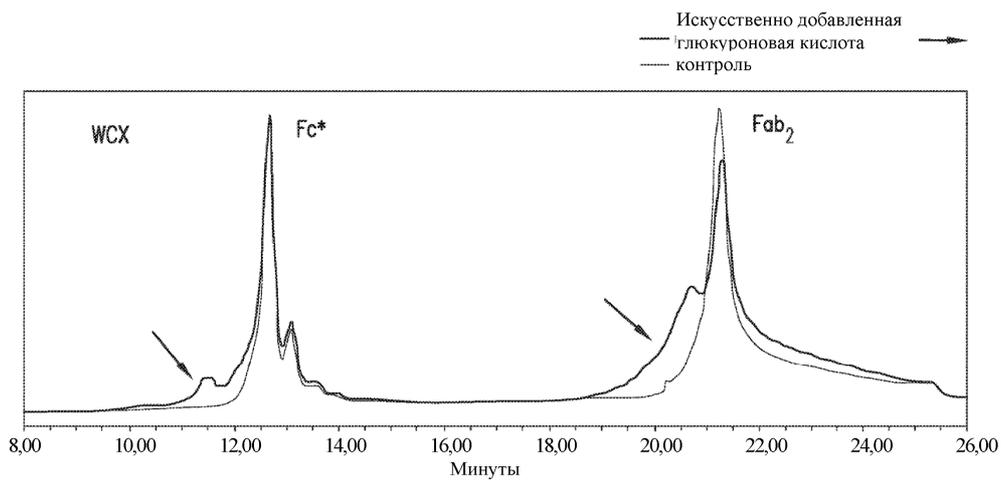


Фиг. 1M

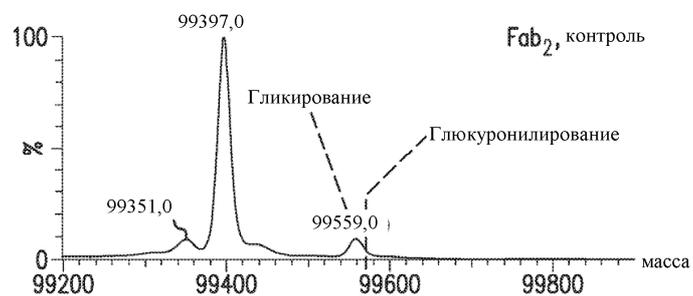


Фиг. 1N

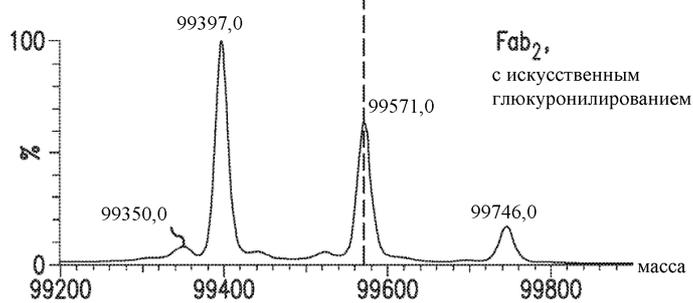




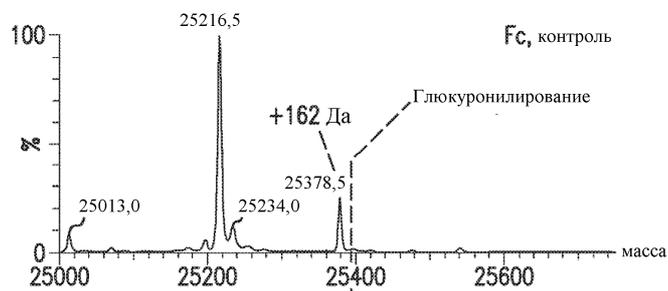
Фиг. 4А



Фиг. 4В

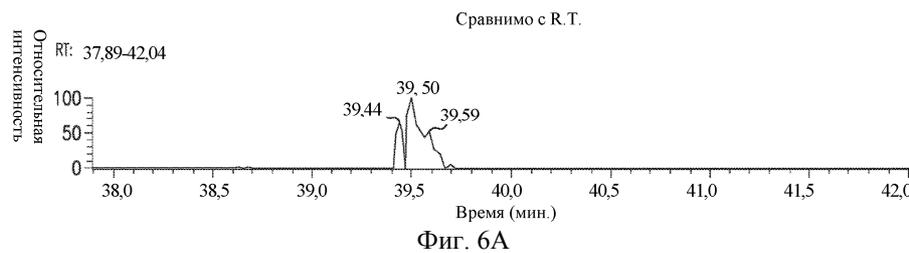
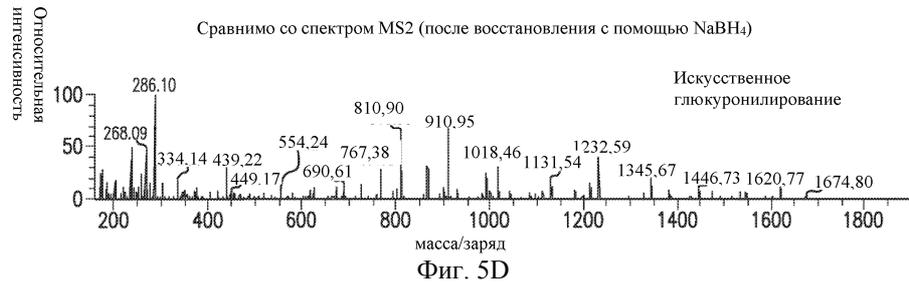
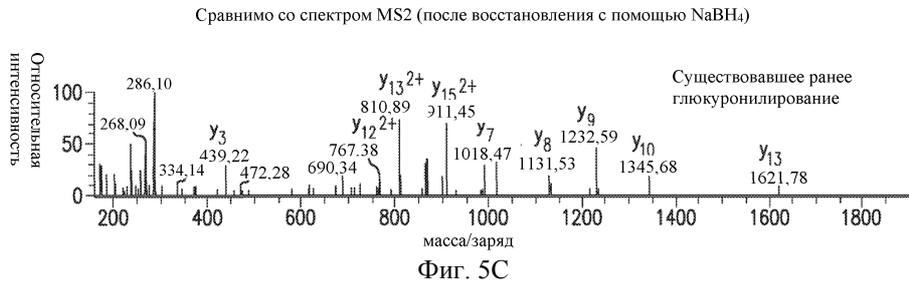
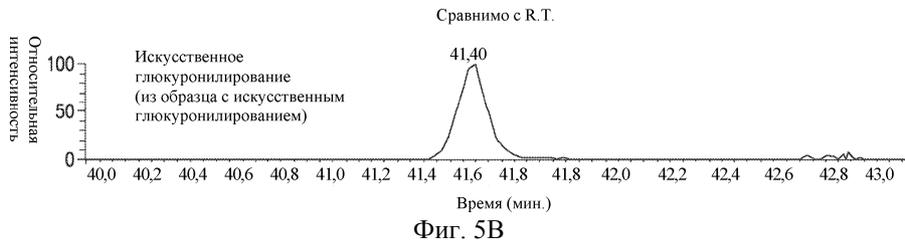
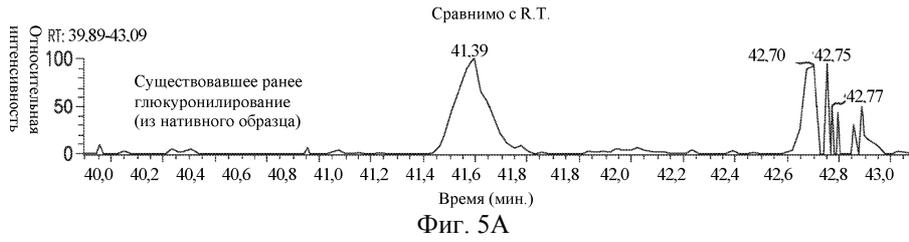
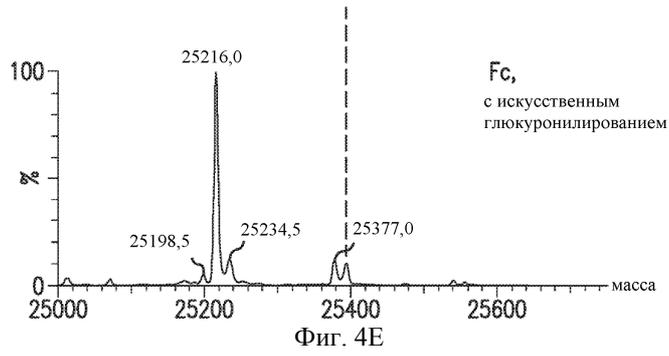


Фиг. 4С

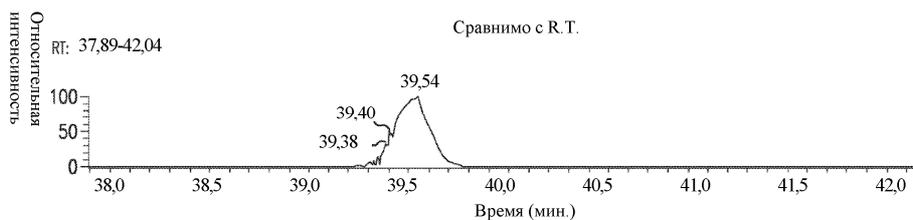


Фиг. 4D

044298

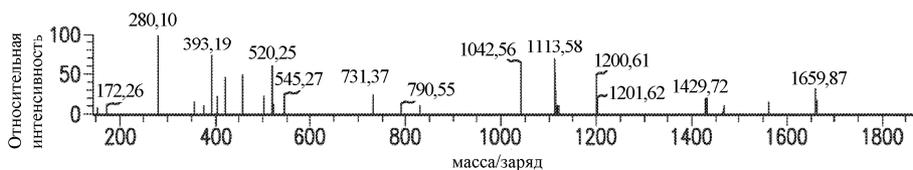


044298



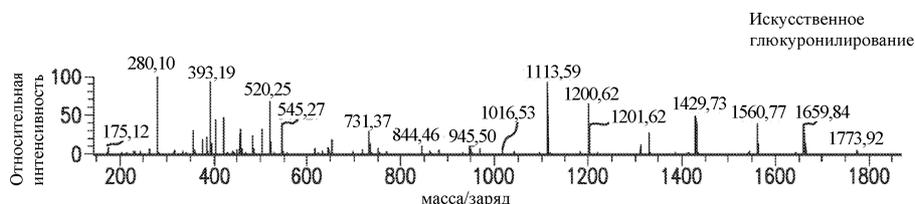
Фиг. 6В

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

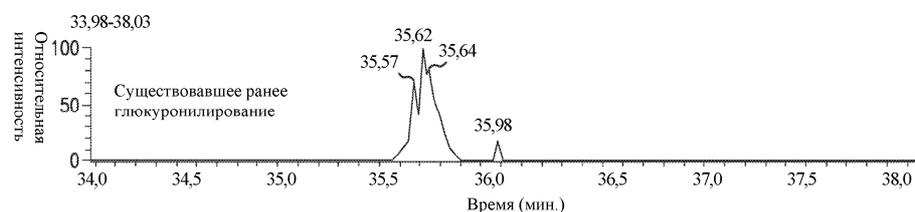


Фиг. 6С

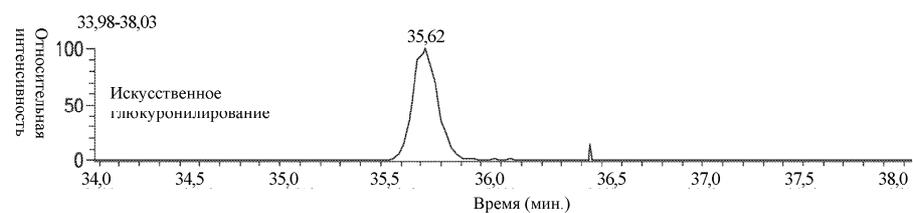
Сравнимо со спектром MS2 (после восстановления с помощью  $\text{NaBH}_4$ )



Фиг. 6D

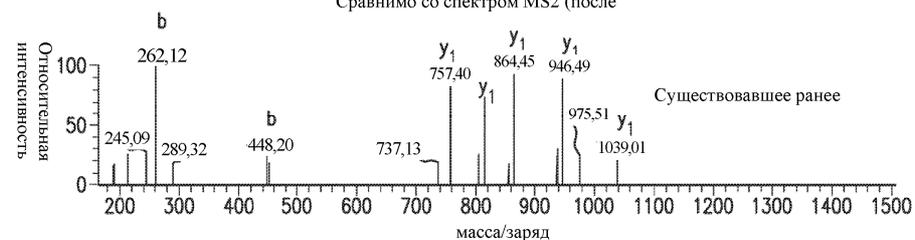


Фиг. 7А



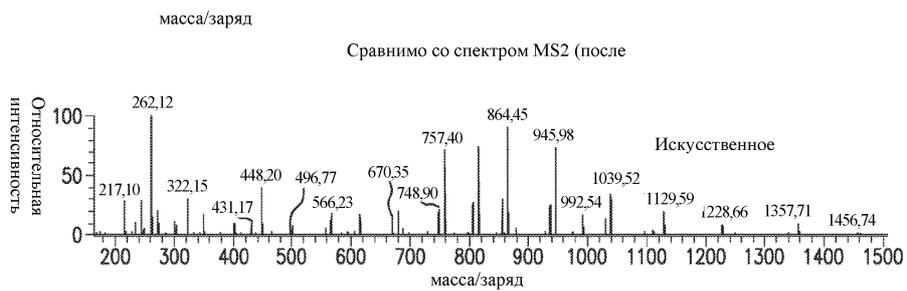
Фиг. 7В

Сравнимо со спектром MS2 (после



Фиг. 7С

044298



Фиг. 7D

