



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.25

(21) Номер заявки
202192056

(22) Дата подачи заявки
2020.01.23

(51) Int. Cl. **G01N 30/88** (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
G01N 30/74 (2006.01)

**(54) КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДИМЕРОВ В
СОВМЕСТНЫХ СОСТАВАХ**

(31) 62/796,794; 62/852,591

(32) 2019.01.25; 2019.05.24

(33) US

(43) 2022.02.21

(86) PCT/US2020/014825

(87) WO 2020/154525 2020.07.30

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

(72) Изобретатель:
Янь Юэтянь, Ванг Шунхай (US)

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

(56) BAÅ AK KÅ174KRER ET AL.: "Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography", PHARMACEUTICAL RESEARCH, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS-PLENUM PUBLISHERS, NL, vol. 27, no. 10, 3 August 2010 (2010-08-03), pages 2197-2204, XP019828053, ISSN: 1573-904X, cited in the application, abstract, page 2198, right-hand column, lines 12-21, page 2199, left-hand column, paragraph 3, page 2199, left-hand column, last paragraph, page 2199, left-hand column, paragraph 2, page 2199, left-hand column, lines 17-44
PAZEHÖSKI ET AL.: "Stalking metal-linked dimers", JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY, ELSEVIER INC, US, vol. 102, no. 3, 28 November 2007 (2007-11-28),

pages 522-531, XP022493072, ISSN: 0162-0134, DOI:10.1016/J.JINORGBIO.2007.10.027, page 526, left-hand column, line 8 - page 527, right-hand column
GYSLER J. ET AL.: "Utility of isotachopheresis-capillary zone electrophoresis, mass spectrometry and high-performance size-exclusion chromatography for monitoring of interleukin-6 dimer formation", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 841, no. 1, 7 May 1999 (1999-05-07), pages 63-73, XP004165248, ISSN: 0021-9673, DOI:10.1016/S0021-9673(99)00257-5, the whole document

R. JEREMY WOODS ET AL.: "LC-MS characterization and purity assessment of a prototype bispecific antibody", MABS, vol. 5, no. 5, 1 September 2013 (2013-09-01), pages 711-722, XP055105145, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.25488, page 716, right-hand column, page 712, right-hand column, lines 37-49; figure 1

THOMAS SPRETER VON KREUDENSTEIN ET AL.: "Improving biophysical properties of a bispecific antibody scaffold to aid developability: Quality by molecular design", MABS, vol. 5, no. 5, 1 September 2013 (2013-09-01), pages 646-654, XP055526148, US, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.25632, page 653, left-hand column, lines 17-48

BARZEN-HANSON KRISTA A. ET AL.: "Quantitation of carbohydrate monomers and dimers by liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry", CARBOHYDRATE RESEARCH, PERGAMON, GB, vol. 468, 12 August 2018 (2018-08-12), pages 30-35, XP085467604, ISSN: 0008-6215, DOI:10.1016/J.CARRES.2018.08.007, abstract

(57) В изобретении представлены способы и система для идентификации димерных молекул с использованием онлайн хроматографии и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. Также представлены способы и система для количественного определения гетеродимерных молекул с использованием иммунопреципитации и жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.

Область техники изобретения

Изобретение в целом относится к способу и системе для идентификации димерных молекул с использованием онлайн хроматографии и масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением и количественному определению гетеродимерных молекул с использованием иммунопреципитации и жидкостной хроматографии - масс-спектрометрии.

Уровень техники

Белковые биофармацевтические продукты стали важными лекарственными средствами для лечения рака, аутоиммунного заболевания, инфекции и кардиометаболических расстройств, и они представляют собой один из наиболее быстрорастущих сегментов продуктов фармацевтической промышленности.

Стратегия совместного составления двух или более терапевтических моноклональных антител (mAb) и/или активных белков в один конечный лекарственный продукт в настоящее время приобрела большую популярность, предлагая несколько преимуществ, в том числе повышенную эффективность, общее снижение нежелательных явлений и повышенное удобство для пациента и соблюдение режима лечения. Составление двух различных mAb и/или активных белков в один состав может быть проблематичным и предусматривает выбор вспомогательных веществ и условий, которые могут представлять собой компромисс. Помимо проблем разработки состава, совместно составленные лекарственные средства также представляют собой значительные проблемы для аналитической характеристики. Например, дифференциация и количественное определение различных димерных форм, присутствующих в совместно составленном лекарственном средстве в нормальных условиях хранения или стрессовых условиях могут быть проблематичными и зачастую являются недостижимыми посредством традиционных способов, таких как эксклюзионная хроматография.

Белковые биофармацевтические продукты, в том числе совместно составленные препараты, должны соответствовать достаточно высоким стандартам чистоты. Таким образом, может быть важным отслеживать какие-либо примеси в совместно составленном лекарственном средстве на различных этапах разработки, производства, хранения и обработки лекарственного средства. Аналитические способы анализа для характеристики должны демонстрировать достаточную точность и разрешение для обнаружения и количественного определения необходимого продукта. Прямой анализ может требовать выделения продукта в достаточно большом количестве для анализа, что является нежелательным и возможно лишь в отдельных случаях.

В данной области давно существует потребность в способе и/или системе характеристики совместно составленных препаратов.

Сущность изобретения

Рост разработки, производства и продажи белковых биофармацевтических продуктов привел к растущему спросу на характеристику белкового биофармацевтического продукта вместе с возможными примесями. Разработка стабильных совместно составленных препаратов является дополнительной проблемой, поскольку она требует определения стабильности и разложения отдельных белков, присутствующих в смеси антител. Такое определение зачастую является сложным вследствие большого количества белков в составе, образования гетеродимерных молекул, гомодимерных молекул и подобия между такими белками.

Иллюстративные варианты осуществления, раскрытые в данном документе, удовлетворяют указанные выше требования, обеспечивая способы и/или систему идентификации димерных молекул и/или количественного определения гетеродимерных молекул.

В настоящем раскрытии, по меньшей мере в его части, представлен способ идентификации димерных молекул. В одном иллюстративном варианте осуществления способ идентификации димерных молекул включает приведение в контакт образца, содержащего виды димеров, с хроматографической системой, включающей смолу для хроматографии, промывку указанной смолы с использованием подвижной фазы с получением фильтрата, включающего виды димеров, и идентификацию димерных молекул в указанном элюенте с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать хроматографическую систему со смолой для эксклюзионной хроматографии.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать связывание масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу для хроматографии.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать связывание масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, работающий в неденатурирующих условиях.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, работающий в неденатурирующих условиях.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать по меньшей мере один делитель потока по меньшей мере с тремя путями для связывания масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать по меньшей мере один делитель потока по меньшей мере с тремя путями для связывания ультрафиолетового детектора с хроматографической системой, содержащей смолу.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать по меньшей мере один делитель потока по меньшей мере с тремя путями для связывания ультрафиолетового детектора и масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать по меньшей мере один делитель потока по меньшей мере с тремя путями для связывания масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать по меньшей мере один делитель потока по меньшей мере с тремя путями для связывания ультрафиолетового детектора с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать по меньшей мере один делитель потока по меньшей мере с тремя путями для связывания ультрафиолетового детектора и масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать промывку смолы с использованием подвижной фазы с получением фильтрата, включающего виды димеров, причем элюент можно вводить в ультрафиолетовый детектор посредством по меньшей мере одного делителя потока по меньшей мере с тремя путями, со скоростью потока от около 0,2 мл/мин. до около 0,4 мл/мин.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать подвижную фазу, содержащую летучую соль.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать подвижную фазу, содержащую ацетат аммония.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать промывку смолы подвижной фазой со скоростью потока от около 0,2 мл/мин. до около 0,4 мл/мин.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать подвижную фазу с рН около 6,8.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать образец, содержащий виды димеров в количестве от около 10 мкг до около 100 мкг.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать виды димеров, содержащие антитело.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать виды димеров, содержащие слитый белок.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением со скоростью потока от около 10 нл/мин. до около 50 нл/мин.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением с напряжением при электрораспылении от около 0,8 кВ до около 1,5 кВ.

В одном аспекте данного варианта осуществления представлен способ идентификации димерных молекул, причем виды димеров могут представлять собой виды гомодимеров.

В одном аспекте данного варианта осуществления представлен способ идентификации димерных молекул, причем виды димеров могут представлять собой виды гетеродимеров.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации димерных молекул может включать приведение в контакт образца, содержащего виды димеров, с хроматографической системой, содержащей смолу для хроматографии, причем образец может включать мономеры белка.

В настоящем раскрытии, по меньшей мере в его части, представлена система, включающая хроматографическую колонку, содержащую смолу для хроматографии. В одном иллюстративном варианте осуществления система включает хроматографическую колонку, содержащую

хроматографическую смолу, причем хроматографическая колонка может быть способна получать подвижную фазу и образец, содержащий белок, и масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

В одном аспекте данного варианта осуществления система может включать хроматографическую колонку, содержащую смолу для эксклюзионной хроматографии.

В одном аспекте данного варианта осуществления система может включать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением с возможностью связывания с указанной хроматографической колонкой.

В одном аспекте данного варианта осуществления система может включать масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением с возможностью запуска в неденатурирующих условиях.

В одном аспекте данного варианта осуществления система может включать нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

В одном аспекте данного варианта осуществления система может включать хроматографическую колонку с возможностью связывания с масс-спектрометром с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями.

В одном аспекте данного варианта осуществления система может включать хроматографическую колонку с возможностью связывания ультрафиолетового детектора с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями.

В одном аспекте данного варианта осуществления система может включать хроматографическую колонку с возможностью связывания с ультрафиолетовым детектором и масс-спектрометром с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями.

В одном аспекте данного варианта осуществления система может иметь возможность идентифицировать виды димеров.

В настоящем раскрытии, по меньшей мере в его части, представлен способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, при этом указанный способ включает иммобилизацию антитела, специфического к первому белку, на твердой поверхности, инкубацию образца указанным антителом, захват осажденного образца, сбор элюата, обработка осажденного образца первым соединением, обработка элюата вторым соединением, смешивание обработанного осажденного образца и по меньшей мере части обработанного элюата с образованием смеси и анализ смеси с использованием жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометром для количественного определения гетеродимерных молекул в образце.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку на твердой поверхности, причем первый белок может представлять собой моноклональное антитело.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку, на твердой поверхности, причем твердая поверхность содержит магнитные гранулы.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку, на твердой поверхности, причем твердая поверхность содержит стрептавидин.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку на твердой поверхности и захват осажденного образца, причем осажденный образец включает виды гетеродимеров, связанные с антителом, специфическим к первому белку, на твердой поверхности.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку на твердой поверхности и захват осажденного образца, причем осажденный образец состоит из гетеродимерных молекул, связанных с антителом, специфическим к первому белку, на твердой поверхности.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку, на твердой поверхности, захват осажденного образца, ресуспендирование осажденного образца и нагревание ресуспендированного осажденного образца.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку на твердой поверхности, захват осажденного образца и сбор фильтрата.

иммобилизацию антитела, специфического к первому белку, на твердой поверхности, захват осажденного образца и сбор фильтрата, и обработку захваченного осажденного образца первым соединением, а фильтрата вторым соединением, и добавление восстанавливающего средства к обработанному осажденному образцу.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку, на твердой поверхности, захват осажденного образца и сбор фильтрата, и обработку захваченного осажденного образца первым соединением, а фильтрата вторым соединением, и добавление восстанавливающего средства к обработанному фильтрату.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку, на твердой поверхности, захват осажденного образца и сбор фильтрата, и обработку захваченного осажденного образца первым соединением, а фильтрата вторым соединением, смешивание обработанного осажденного образца и около 10% обработанного фильтрата с образованием смеси, и анализ смеси с использованием жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометром для количественного определения гетеродимерных молекул в образце.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку, на твердой поверхности, захват осажденного образца и сбор фильтрата, и обработку захваченного осажденного образца первым соединением, а фильтрата вторым соединением, смешивание обработанного осажденного образца и около 10% обработанного фильтрата с образованием смеси, расщепление смеси, и анализ смеси с использованием жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометром для количественного определения гетеродимерных молекул в образце.

В настоящем раскрытии, по меньшей мере в его части, представлен способ количественного определения гетеродимерных молекул. В одном иллюстративном варианте осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул включает иммунопреципитацию гетеродимерных молекул и количественное определение гетеродимерных молекул посредством применения стабильного способа нанесения изотопной метки с последующей жидкостной хроматографией, связанной с масс-спектрометром.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул может включать виды гетеродимеров, в том числе антитело.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул может включать виды гетеродимеров, в том числе слитый белок.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул может включать иммунопреципитацию гетеродимерных молекул посредством применения антитела на твердой поверхности.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул может включать иммунопреципитацию гетеродимерных молекул посредством применения антитела на твердой поверхности, причем антитело может связываться с белком из гетеродимера.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул может включать применение стабильного способа нанесения изотопной метки с алкилирующим соединением.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул может включать применение стабильного способа нанесения изотопной метки с алкилирующим соединением.

В одном аспекте данного варианта осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул может включать осуществление расщепления помимо применения стабильного способа нанесения изотопной метки.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показан иллюстративный вариант осуществления системы, способной идентифицировать виды димеров.

На фиг. 2 показан иллюстративный вариант осуществления способа, применяемого для количественного определения гетеродимерных молекул в образце совместно составленного препарата.

На фиг. 3 показан способ количественного определения неспецифического связывания белка с антителом в отрицательном образце в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 4 показан иллюстративный вариант осуществления способа, применяемого для количественного определения гетеродимерных молекул в образце совместно составленного препарата.

На фиг. 5 показано шесть димеров, которые возможно могут присутствовать в совместном составе, содержащем три моноклональных антитела.

На фиг. 6 показана идентификация гетеродимерных молекул в совместном составе, содержащем три моноклональных антитела, с использованием нативного анализа SEC-MS в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 7 показано количественное определение гетеродимерных молекул в совместном составе, содержащем три моноклональных антитела, с использованием нативного анализа SEC-MS в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 8 показано три димера, которые возможно могут присутствовать в совместном составе, содержащем моноклональные антитела и слитый белок.

На фиг. 9 показана экстракционная ионная хроматограмма (XIC) совместного состава, дифференцированного в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 10 показано определение отношения массы к заряду димерных молекул совместного состава, дифференцированного в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 11 показан рабочий процесс иммунопреципитации и стратегии нанесения изотопной метки для количественного определения гетеродимера в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 12 показаны отношения массы к заряду фракций анализа с соосаждением и фильтрата, полученного для совместного состава в стрессовых условиях холодного белого света и отрицательного образца в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 13 показана диаграмма для гетеродимера% слитого белка 1 в четырех пептидах слитого белка 1, обнаруженного в образцах, подверженного различным стрессовым условиям, причем количественное определение осуществляли в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 14 показана диаграмма отношения массы к заряду пептида 1 слитого белка 1 (как легких, так и тяжелых фрагментов) в образцах, подверженных различным стрессовым условиям, причем количественное определение гетеродимера, содержащего слитый белок 1, осуществляли в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 15 показана диаграмма отношения массы к заряду пептида 2 слитого белка 1 (как легких, так и тяжелых фрагментов) в образцах, подверженных различным стрессовым условиям, причем количественное определение гетеродимера, содержащего слитый белок 1, осуществляли в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 16 показана диаграмма отношения массы к заряду пептида 3 слитого белка 1 (как легких, так и тяжелых фрагментов) в образцах, подверженных различным стрессовым условиям, причем количественное определение гетеродимера, содержащего слитый белок 1, осуществляли в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 17 показана диаграмма отношения массы к заряду пептида 4 слитого белка 1 (как легких, так и тяжелых фрагментов) в образцах, подверженных различным стрессовым условиям, причем количественное определение гетеродимера, содержащего слитый белок 1, осуществляли в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 18 показаны расчеты для преобразования % гетеродимера в % гетеродимера слитого белка 1, причем количественное определение гетеродимера, содержащего слитый белок 1, осуществляли в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

Фиг. 19 представляет собой диаграмму % гетеродимера слитого белка 1 в образцах для испытания, приведенных к % гетеродимера слитого белка в образце для испытания без разведения, причем количественное определение гетеродимера, содержащего слитый белок 1, осуществляли в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 20 показан график % гетеродимера слитого белка 1 по сравнению с % образца в стрессовых условиях холодного белого света в смешанном образце для трех пептидов, применяемых для количественного определения слитого белка 1, причем количественное определение гетеродимера, содержащего слитый белок 1, осуществляли в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 21 показан % гетеродимера слитого белка 1 в образцах от совместно составленных препаратов, хранящихся в условиях окружающей среды, причем количественное определение гетеродимера, содержащего слитый белок 1, осуществляли в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

Подробное описание

Идентификация и количественное определение белков в белковых биофармацевтических продуктах могут быть очень важными в ходе производства и разработки продукта. Анализ примесей в любом белковом биофармацевтическом продукте может оказаться необходимым при разработке безопасного и эффективного продукта. Следовательно, эффективный способ и/или рабочий процесс для характеристики примесей может быть преимущественным.

Большинство биофармацевтических продуктов могут содержать один белок. В некоторых случаях, несколько белков, направленных на одну мишень или несколько мишеней, введенных в комбинации, могут улучшать их диагностические или терапевтические показания и эффективность. Разработка таких совместно составленных препаратов становится все более популярными лекарственными формами (Svend Havelund et al., Investigation of the Physico-Chemical Properties that Enable Co-Formulation of Basal Insulin Degludec with Fast-Acting Insulin Aspart, 32 Pharmaceutical Research 2250-2258 (2015); Sanjay Kalra & Yashdeep Gupta, Injectable Coformulations in Diabetology, 6 Diabetes Therapy 101-111 (2015); Ryzodeg, European Medicines Agency - Find medicine - Raxone, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ryzodeg> (last visited Jan 17, 2019)).

Тем не менее, разработка совместно составленных препаратов имеет несколько проблем, поскольку она требует исследования потенциальных фармакодинамических взаимодействий, потенциальных фармакокинетических взаимодействий, вероятности токсикологических взаимодействий, вероятности изменения уровня или активности эндогенных взаимодействий, и вероятности нарушения эффективности одного из лекарственных средств (Claudia Mueller, Ulrike Altenburger & Silke Mohl, Challenges for the pharmaceutical technical development of protein coformulations, 70 Journal of Pharmacy and Pharmacology 666-674 (2017)). Производство стабильного совместно составленного препарат также может требовать дополнительных попыток обеспечения стабильности еще двух белков на различных стадиях производства.

В ходе хранения, транспортировки и введения конечные совместно составленные продукты могут подвергаться воздействию света, тепла и кислорода и они могут вызывать агрегацию (гомодимерной(ых) и/или гетеродимерной(ых) высокомолекулярной частицы(ц)), паттерн заряда, фрагментацию, химические модификации (например, окисление, дезамидирование) и т.д.

Хорошие характеристики и чувствительность способа анализа имеют решающее значение для обеспечения высокого качества и безопасности конечного совместно составленного продукта. Тем не менее, аналитический подход для разработки и оценки совместно составленных препаратов может значительно более трудозатратным и сложным, чем подход, применяемый для составов, содержащих один белок в качестве активного фармацевтического ингредиента. Это может стать проблемой, поскольку некоторые стандартные способы, применяемые для состава, содержащего один белок, не всегда позволяют дифференцировать белки в совместно составленных препаратах.

Один из способов включает применение эксклюзионной хроматографии (SEC) для характеристики биомолекулярной агрегации и фрагментации в биотехнологической промышленности (Hong Paule et al., Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates, 35 Journal of Liquid Chromatography and Related Technology 2923-2950 (2012)). Разделение молекул посредством SEC основано на дифференциальном взаимодействии молекул с контролируемой пористой структурой на неподвижной фазе. Поскольку в SEC применяются буферные условия, которые сохраняют нативную структуру белков в растворе, он позволяет характеризовать биомолекулы без нарушения их нативной конформации. Кроме того, среди различных режимов обнаружения, которые могут быть связаны с SEC, масс-спектрометрия (MS) позволяет однозначно и точно идентифицировать отдельные компоненты в сложных образцах. Ранее сообщалось о комбинации SEC и MS, в том числе о сборе пиков SEC с последующей MS прямой инфузией (Başak Kükrer et al., Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography, 27 Pharmaceutical Research 2197-2204 (2010); François Debaene et al., Innovative Native MS Methodologies for Antibody Drug Conjugate Characterization: High Resolution Native MS and IM-MS for Average DAR and DAR Distribution Assessment, 86 Analytical Chemistry 10674-10683 (2014)) или онлайн-SEC-MS (Khaja Muneeruddin et al., Characterization of Small Protein Aggregates and Oligomers Using Size Exclusion Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry, 86 Analytical Chemistry 10692-10699 (2014); C. F. McDonagh et al., Engineered antibody-drug conjugates with defined sites and stoichiometries of drug attachment, 19 Protein Engineering Design and Selection 299-307 (2006)). Тем не менее, для прямой ионизации высокого потока, создаваемого при разделении SEC, требуются жесткие условия ионизации, которые часто несовместимы с собственным анализом MS, тем самым ограничивая полезность объединения данных технологий для анализа нековалентных взаимодействий. Кроме того, чувствительность масс-спектрометра может пострадать вследствие высоких концентраций соли, применяемых в буферах SEC.

В дополнение к указанию количественное определение гетеродимера(ов), образованных в совместно составленном продукте, также может вызывать проблемы, поскольку количество образованного(ых) гетеродимера(ов) необходимо оценивать в присутствии мономеров белка и любого присутствующего гомодимера(ов).

Учитывая ограничения существующих способов, были разработаны эффективные и действенные способы определения и количественного определения димерных молекул.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Несмотря на то, что любые способы и материалы, подобные или эквивалентные

описанным в данном документе, могут применяться на практике или при испытании, теперь будут описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в настоящий документ посредством ссылки.

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

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного раскрытия представлен способ идентификации димерных молекул в совместно составленном препарате.

В контексте данного документа "совместно составленный препарат" включает два или более активные фармацевтические ингредиенты в стандартной лекарственной форме. Данную лекарственную форму можно применять для лечения, предупреждения или облегчения определенного болезненного состояния посредством нацеливания на различные молекулярные мишени и получения общего улучшения медицинского состояния пациента за счет дополнительных и/или синергетических эффектов по сравнению со стандартным(и) лекарственным(ами) средством(ами) (Claudia Mueller, Ulrike Altenburger & Silke Mohl, Challenges for the pharmaceutical technical development of protein coformulations, 70 Journal of Pharmacy and Pharmacology 666-674 (2017)). Некоторые из преимуществ включают повышенную эффективность по сравнению с одним лекарственным средством, общее снижение нежелательных явлений, повышение удобства для пациента и соблюдение режима лечения (повышенная приверженность пациента лечению, упрощенное руководство пациента и обучение), сокращение затрат на здравоохранение (производство и закупка), упрощение процессов поставки и новые возможности в рамках управления жизненным циклом существующих продуктов на рынке.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления два или более активных фармацевтических ингредиентов могут представлять собой белки.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления совместно составленный препарат может включать по меньшей мере два белка.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления совместно составленном препарате может включать по меньшей мере три белка.

Применяемый в данном документе термин "белок" включает любой аминокислотный полимер с ковалентно связанными амидными связями. Белки содержат одну или более аминокислотных полимерных цепей, обычно известных в данной области как "полипептиды". "Полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, соответствующих встречающимся в природе структурным вариантам и их синтетическим не встречающимся в природе аналогам, связанным посредством пептидных связей, соответствующих встречающимся в природе структурным вариантам, и их синтетическим не встречающимся в природе аналогам. "Синтетические пептиды или полипептиды" относятся к не встречающимся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Известны различные способы твердофазного пептидного синтеза. Белок может содержать один или несколько полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, применяемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других Fc-слитых белков химерного рецептора, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител и биспецифических антител. В другом иллюстративном аспекте белок может включать фрагменты антитела, нанотела, химеры рекомбинантного антитела, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как система бакуловирусов насекомых, системы дрожжей (например, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (например, CHO-клетки и производные CHO-клеток, такие как CHO-K1-клетки). Обзор биотерапевтических белков и их получения см. в Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (BIOTECHNOL. GENET. ENG. REV. 147-175 (2012)). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Данные модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, FLAG-метку, мальтозосвязывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), мус-эпитоп, флуоресцентные метки и другие красители и т.п. Белки могут быть классифицированы на основании композиций и растворимости и, таким образом, могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и фибриллярные белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональные

антитела или Fc-слитый белок. В одном аспекте белок представляет собой белок против VEGF. В конкретном аспекте VEGF-белок представляет собой афлиберцепт.

Применяемый в данном документе термин "антитело", включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). V_H - и V_L -области могут быть дополнительно подразделены на области гиперпеременности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных иллюстративных вариантах осуществления FR антитела против big-ET-1 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Применяемый в данном документе термин "антитело" также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела. Термины "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной геномной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Используемый в данном документе термин "фрагмент антитела" включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент Fc, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), а также триатела, тетраатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а scFv-белки представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. Фрагмент антитела можно получить различными способами. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем с помощью фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно содержать многомолекулярный комплекс.

Применяемый в данном документе термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, посредством любых способов, доступных или известных в данной области. Моноклональные антитела, пригодные для использования в настоящем изобретении, могут быть получены с использованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, включая использование технологий гибридомной, рекомбинантной и фаговой индикации или их комбинации.

Применяемый в данном документе термин "Fc-слитые белки" включает часть или все два или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые не слиты в их природном состоянии. Препарат слитых белков, содержащий определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антитела (включая домен Fc), был описан, например, в Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature

344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, стр. 10.19.1-10.19.11, 1992. "Рецепторные Fc-слитые белки" включают в себя один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирную область, за которым следуют домены CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок содержит два или более различных рецепторных цепей, которые связываются с одним или более лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, как, например, ловушка IL-1 (например, рилоноцепт, который содержит область, связывающую лиганд ИЛ-1RacP, слитую с внеклеточной областью ИЛ-1R1, слитой с Fc из hIgG1; см. патент США № 6927004, который включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте), или ловушку VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Flt1, слитый с доменом 3 Ig рецептора Flk1 VEGF, слитый с Fc hIgG1; например, SEQ ID NO: 1; см. патент США. №№ 7087411 и 7279159, которые включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления совместно составленный препарат может включать виды димеров. В одном аспекте совместно составленный препарат может включать виды гомодимеров. В некоторых других конкретных иллюстративных вариантах осуществления совместно составленный препарат может включать виды гетеродимеров. В другом аспекте совместно составленный препарат может включать виды гомодимеров и виды гетеродимеров.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления совместно составленный препарат может включать виды димеров в качестве примеси.

Применяемый в данном документе термин "примесь" может включать любой нежелательный белок, присутствующий в белковом биофармацевтическом продукте. Примесь может включать технологические и родственные примеси. Примесь также может иметь известную структуру, частично характеризованную или неидентифицированную. Технологические примеси могут быть образованы в ходе процесса производства и могут включать три основные категории: образованные из клеточного субстрата, образованные из клеточной культуры и образованные в ходе последующих стадий. Примеси, образованные из клеточного субстрата, включают без ограничения белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или общую ДНК клетки-хозяина). Примеси, полученные из клеточной культуры, включают без ограничения индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Образованные в ходе последующих стадий примеси включают без ограничения ферменты, химические и биохимические реагенты для обработки (например, бромистый цианоген, гуанидин, окисляющие и восстанавливающие средства), неорганические соли (например, тяжелых металлов, мышьяка, иона неметалла), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие выщелачиваемые продукты. Родственные примеси (например, прекурсоры, некоторые продукты разложения) могут представлять собой молекулярные варианты, возникающие в ходе производства и/или хранения, которые не обладают свойствами, сопоставимые со свойствами необходимого продукта относительно активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут требовать значительных усилий для выделения и характеристики с целью идентификации типа модификации(ий). Родственные примеси могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образованы гидрофильными ферментами или химическими веществами, которые катализируют отщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают без ограничения дезамидированные; изомеризованные, ошибочно соединенные посредством S-S, окисленные или измененные конъюгированные формы (например, гликозилированные, фосфорилированные). Модифицированные формы также могут включать любые посттрансляционные модифицированные формы. Агрегаты включают димеры и большие величины необходимого продукта. (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept. of Health and Humans Services).

Применяемый в данном документе общий термин "посттрансляционные модификации" или "PTM" относятся к ковалентным модификациям, которым подвергаются полипептиды, либо в ходе (ко-трансляционная модификация) или после (посттрансляционная модификация) их рибосомного синтеза. PTM обычно вводятся специфическими ферментами или ферментными путями. Многие из них возникают в месте специфической характерной белковой последовательности (сигнатурной последовательности) внутри белкового каркаса. Было зарегистрировано несколько сотен PTM, и данные модификации неизменно влияют на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. "Proteins" (2014) second edition, published by Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансляционные модификации включают без ограничения отщепление, N-концевые удлинения, разложение белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование лизиновых остатков биотином), амидирование C-конца, гликозилирование, йодирование, ковалентное прикрепление простетических групп, ацетилирование (добавление ацетиловой группы, обычно у N-конца белка), алкилирование (добавление алкильной группы (например, метильной, этильной, пропиловой) обычно у лизинового или аргининового остатков), метилирование, аденилирование, ADP-рибозилирование, ковалентное сшивание внутри, или между, полипептидных цепей, сульфонирование, пренилирование,

зависимые от витамина С модификации (гидроксирования пролина и лизина и амидирование карбокси-конца), зависящая от витамина К модификация, причем витамин К представляет собой кофактор в карбоксилировании остатков глутамовой кислоты, обеспечивающем образование γ -карбоксиглутамата (glu-остатка), глутамилирование (ковалентная связь остатков глутамовой кислоты), глицилирование (ковалентная связь глициновых остатков), гликозилирование (добавление гликозильной группы либо к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, обеспечивающее гликопротеин), изопренилирование (добавление изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липоилирование (прикрепление липоатной функциональной группы), фосфопантетеинилирование (добавление 4'-фосфопантетеинильного фрагмента из кофермента А, как в жирной кислоте, поликетиде, нерибосомном пептиде и биосинтезе лейцина), фосфорилирование (добавление фосфатной группы, обычно к серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфатирование (добавление сульфатной группы, обычно к тирозиновому остатку). Посттрансляционные модификации, которые изменяют химическую природу аминокислоты включают без ограничения цитруллинирование (преобразование аргинина в цитруллин посредством дезиминирования), и дезамидирование (преобразование глутамина в глутамовую кислоту или аспарагин в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, которые включают структурные изменения, включают без ограничения образование дисульфидных мостиков (ковалентной связи двух цистеиновых аминокислот) и протеолитическое расщепление (отщепление белка у пептидной связи). Определенные посттрансляционные модификации включают добавление других белков или пептидов, например, ISG-илирование (ковалентная связь с белком ISG15 (ген, стимулируемый интерфероном)), SUMO-илирование (ковалентная связь с белком SUMO (малый убиквитин-подобный модификатор)) и убиквитинирование (ковалентная связь с белком убиквитин). Более подробный контролируемый словарь PTM, созданный UniProt, см. European Bioinformatics Institute Protein Information Resource SIB 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.).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления виды димеров могут быть идентифицированы посредством приведения в контакт образца, включающего виды димеров, с хроматографической системой.

Применяемый в данном документе термин "хроматография" относится к процессу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью или газом, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального разделения химических единиц при их протекании вокруг или через стационарную жидкость или твердую фазу. Неограничивающие примеры хроматографии включают традиционную обращеннофазовую (RP), ионообменную (IEX) хроматографию, хроматографию со смешанным режимом и хроматографию с нормальными фазами (NP).

Применяемый в данном документе термин "хроматография со смешанным режимом (MMC)" или "хроматография на мультимодальных разделительных матрицах" включает хроматографический способ, в котором растворенные вещества взаимодействуют со стационарной фазой посредством более чем одного режима или механизма взаимодействия. MMC можно применять в качестве альтернативного или комплементарного инструмента к традиционной обращеннофазовой (RP), ионообменной (IEX) и нормальнофазовой хроматографии (NP). В отличие от хроматографии RP, NP и IEX, в которых гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие и ионное взаимодействие, соответственно, являются доминирующими режимом взаимодействия, в хроматографии со смешанным режимом можно применять комбинацию двух или более данных режимов взаимодействия. Среда для хроматографии со смешанным режимом может обеспечивать уникальную селективность, которая не может быть воспроизведена посредством хроматографии с одним режимом. Хроматография со смешанным режимом также может обеспечивать потенциальную экономию затрат и гибкость в работе по сравнению со способами на основе аффинности.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматография может представлять собой эксклюзивную хроматографию.

Применяемые в данном документе термины "смола SEC для хроматографии" или "среда SEC для хроматографии" применяются взаимозаменяемо и могут включать любой вид твердой фазы, применяемой в SEC, которая отделяет примесь от необходимого продукта (например, загрязняющее вещество гомодимера для продукта на основе биспецифического антитела). Объем смолы, длина и диаметр применяемой колонки, а также динамическая мощность и скорость потока могут зависеть от нескольких параметров, таких как объем обрабатываемой жидкости, концентрация белка в жидкости, подвергаемой данному процессу.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации димерных молекул может включать приведение в контакт образца, содержащего белковый биофармацевтический продукт, с хроматографической системой с использованием подвижной фазы с получением фильтрата, содержащего виды димеров; и идентификация белка в указанном элюенте с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением.

Применяемый в данном документе термин "масс-спектрометр" включает устройство, способное идентифицировать конкретные виды молекул и точное измерение их масс. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в котором полипептид или пептид могут быть элюированы для детекции и/или характеристики. Масс-спектрометр может включать три основные части: источник ионов, масс-анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в образовании ионов газовой фазы. Атомы, молекулы или кластеры определяемого вещества могут переноситься в газовую фазу и ионизированы одновременно (как в ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов в основном зависит от применения.

В некоторых вариантах осуществления масс-спектрометр может представлять собой масс-спектрометр с электрораспылением.

Применяемый в данном документе термин "ионизация электрораспылением" или "ESI" относится к процессу ионизации распылением, в котором либо катионы, либо анионы в растворе переносятся в газовую фазу посредством образования и удаления растворителя при атмосферном давлении потока капель с высоким зарядом, возникающих вследствие применения разницы потенциалов между наконечником иглы для электрораспыления, содержащим раствор, и противозлектродом. Обычно существует три основные стадии производства ионов в газовой фазе из ионов электролита в растворе. К ним относятся: (а) производство заряженных капель в наконечнике для инфузии ES; (b) сокращение заряженных капель посредством выпаривания растворителя и повторного разложения капель, обеспечивающих небольших высокозаряженных капель, способных вырабатывать ионы газовой фазы; и (с) механизм, посредством которого ионы газовой фазы вырабатываются из небольших и высокозаряженных капель. Стадии (а)-(с) обычно происходят в области устройства с атмосферным давлением.

Применяемый в данном документе термин "установка для инфузии с электрораспылением" относится к системе ионизации электрораспылением, которая сопоставима с масс-спектрометром, применяемым для анализа массы белка. При ионизации электрораспылением игла для электрораспыления имеет отверстие, расположенное рядом с входным отверстием спектрометра. Образец, содержащий представляющий интерес белок, может закачиваться через иглу шприца. Электрический потенциал между отверстием иглы шприца и отверстием, ведущим к масс-анализатору, образует распыление ("электрораспыление") раствора. Электрораспыление можно осуществлять при атмосферном давлении и оно обеспечивает высокозаряженные капли раствора. Установка для инфузии с электрораспылением может включать излучатель электрораспыления, распылительный газ и/или источник питания ESI. Установка необязательно может быть автоматической для осуществления аспирации образца, выделения образца, доставки образца и/или распыления образца.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может представлять собой нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

Применяемый в данном документе термин "наноэлектрораспыление" или "нано-распыление" относится к ионизации электрораспылением при очень низкой скорости потока растворителя, как правило, сотни нанолитров раствора образца в 1 мин или ниже, зачастую без применения доставки раствора извне. В установке для инфузии с электрораспылением, образующей наноэлектрораспыление, может применяться статический излучатель наноэлектрораспыления или динамический излучатель наноэлектрораспыления. Статический излучатель наноэлектрораспыления осуществляет непрерывный анализ небольших объемов раствора образца (определяемого вещества) в течение длительного периода. В динамическом излучателе наноэлектрораспыления применяется капиллярная колонка и система доставки растворителя для осуществления хроматографического разделения смесей перед анализом посредством масс-спектрометра.

Применяемый в данном документе термин "масс-анализатор" включает устройство, которое может разделять частицы, то есть, атомы, молекулы или кластеры, в соответствии с их массой. Неограничивающими примерами масс-анализаторов, которые можно применять для быстрого секвенирования белков, являются времяпролетный (TOF), магнитоэлектрический сектор, квадрупольный масс-фильтр (Q), квадрупольная ионная ловушка (QIT), орбитальная ловушка, ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье (FTICR), а также методика ускорительной масс-спектрометрии (AMS).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометрию можно осуществлять в неденатурирующих условиях.

Применяемый в данном документе термин "неденатурирующие условия" или "нативная MS" или "нативная ESI-MS" может включать осуществление масс-спектрометрии в условиях, которые сохраняют нековалентные взаимодействия в определяемом веществе. Подробный обзор нативной MS см. в 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). Некоторые различия между собственным ESI и обычным ESI показаны в табл. 1 (Hao Zhang et al., Native mass spectrometry of photosynthetic pigment-protein complexes, 587 FEBS Letters 1012-1020 (2013)).

Таблица 1

	Нативная ESI	Обычная ESI
Раствор образца	Водный раствор вода, ацетат аммония	Частичный органический раствор вода, муравьиная кислота, ацетонитрил/метанол (pH 1-2)
Условия распыления	10-50 нл/мин. Напряжение при распылении 0,8-1,5 кВ Температуры 20-30°C	10-50 нл/мин. Напряжение при распылении 0,8-1,5 кВ Температуры 20-30°C
Солевая обработка	Обессоливание оффлайн	Обессоливание онлайн/оффлайн с использованием RP-HPLC
Концентрация белка	1-10 мкМ (комплекс)	Менее 1 мкМ (субъединица)
Информация для вывода	Молекулярный вес белкового комплекса и субъединицы Нековалентные взаимодействия Стехиометрия Структура	Молекулярный вес одной субъединицы

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр.

Применяемый в данном документе термин "танDEMная масс-спектрометрия" включает методику, в которой структурную информацию о молекулах образца получают посредством применения нескольких этапов массового отбора и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что образцы молекул могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в интактном состоянии и что они могут быть вызваны распадом некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первой стадии массового отбора. Многостадийную MS/MS, или MSⁿ, можно осуществлять посредством первого выбора и выделения иона прекурсора (MS²), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона (MS³), его фрагментация, выделение вторичного фрагмента (MS⁴), и так до тех пор, пока можно будет получить значимую информацию или сигнал фрагментного иона поддается обнаружению. ТанDEMную MS успешно осуществляли с широким разнообразием комбинаций анализатора. То, какие анализаторы следует комбинировать для определенного варианта применения, определяется множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Две основные категории способов танDEMной MS представляют собой танDEMную в пространстве и танDEMную во времени, но есть также гибриды, где танDEMные во времени анализаторы соединены в пространстве или с танDEMными в пространстве анализаторами. ТанDEMный в пространстве масс-спектрометр включает источник ионов, устройство активации ионов-прекурсоров и по меньшей мере два не захватывающих масс-анализатора. Конкретные функции разделения массы/заряда могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной секции прибора ионы выбирались, диссоциировали в промежуточной области, а ионы продукта затем передавались в другой анализатор для разделения массы/заряда и сбора данных. В танDEMном во времени масс-спектрометре ионы, образующиеся в ионном источнике, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по массе/заряду в одном и том же физическом устройстве.

Выявленные масс-спектрометром пептиды могут применяться в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно применять для характеристики белков посредством сопоставления экспериментальных и теоретических данных MS/MS, последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Характеристика может включать без ограничения секвенирование аминокислот фрагментов белка, определение секвенирования белка, определение секвенирования белка de novo, определение местоположения посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

Применяемый в данном документе термин "база данных" относится к биоинформатическим инструментам, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров MS-MS по всем возможным последовательностям в базе данных. Неограничивающие примеры таких инструментов представляют собой Mascot (<http://www.matrixscience.com>), Spectrum Mill (<http://www.chem.agilent.com>), PLGS (<http://www.waters.com>), PEAKS (<http://www.bioinformaticssolutions.com>), Proteinpilot (<http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot>), Phenyx (<http://www.phenyx-ms.com>), Sorcerer (<http://www.sagenresearch.com>), OMSSA (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/>), X!танDEMный (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>), Protein Prospector (<http://www.prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>) или Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного раскрытия представлен способ количественного определения гетеродимерных молекул.

В некоторых вариантах осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, может включать иммобилизацию антитела, специфического к первому белку на твердой поверхности. Антитело, специфическое к первому белку, можно приготовить посредством любого из известных в литературе способов.

Применяемый в данном документе термин "твердой поверхности" может включать любую поверхность, способную связываться с представляющим интерес антителом. В некоторых вариантах осуществления для образца, содержащего первый белок и второй белок, представляющее интерес антитело может представлять собой антитело, специфическое к первому белку. Неограничивающие примеры твердой поверхности, могут включать аффинные смолы, магнитные гранулы и покрытые пластины с иммобилизованным белком, таким как авидин, стрептавидин или нейтравидин.

В некоторых вариантах осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул может включать иммунопреципитацию гетеродимерных молекул. Иммунопреципитацию можно осуществлять посредством применения антитела, иммобилизованного на твердой поверхности, причем антитело может связываться с одним из многих активных фармацевтических ингредиентов в совместно составленном препарате, и причем активные фармацевтические ингредиенты могут представлять собой белки.

В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий первый белок и второй белок, может быть инкубирован с иммобилизованным антителом, специфическим к первому белку на твердой поверхности. Время инкубации может составлять от нескольких минут до нескольких часов.

В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий первый белок и второй белок, инкубированный с иммобилизованным антителом, специфическим к первому белку на твердой поверхности, может быть извлечен.

В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий первый белок и второй белок, инкубированный с иммобилизованным антителом, специфическим к первому белку на твердой поверхности, может быть центрифугирован. В некоторых конкретных вариантах осуществления центрифугирование может обеспечивать осажденный образец и элюент или супернатант.

В некоторых вариантах осуществления осажденный образец и элюент может быть восстановлен посредством применения восстанавливающего средства.

Применяемый в данном документе термин "восстанавливающий" относится к восстановлению дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающими примерами восстанавливающих средств, применяемых для восстановления белка, являются дитиотреитол (DTT), β-меркаптоэтанол, реактив Элмана, хлористоводородный гидроксилламин, цианоборгидрид натрия, трис-(2-карбоксиэтил)гидрохлорид фосфина (ТСЕР-HCl) или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления осажденный образец и/или элюент можно обрабатывать с использованием соединения или соединений. В некоторых конкретных вариантах осуществления обработка может включать алкилирование. В некоторых других конкретных иллюстративных вариантах осуществления обработка может включать алкилирование сульфгидрильных групп на белке.

Применяемый в данном документе термин "обработка" или "нанесение изотопной метки" может относиться к нанесению химической метки на белок. Неселективные примеры способов нанесения химической метки на белок включают изобарические метки для относительного и абсолютного определения (iTRAQ) с использованием реагентов, таких как 4-plex, 6-plex и 8-plex; восстановительное деметилирование аминов, карбамирование аминов, ¹⁸O-маркирование на С-конце белка, или любая аминокислота- или сульфгидрильная группа белка для нанесения метки на амины или сульфгидрильную группу.

В некоторых вариантах осуществления осажденный образец и/или элюент можно обрабатывать с использованием двух отличающихся соединений, причем два соединения являются изотопами.

В некоторых вариантах осуществления осажденный образец и по меньшей мере часть фильтрата можно смешивать после их обработки или нанесения на них изотопной метки.

В некоторых вариантах осуществления смесь обработанного или меченного изотопами осажденного образца и по меньшей мере части обработанного или меченного изотопами фильтрата может быть расщеплена.

Применяемый в данном документе термин "расщепление" относится к гидролизу одного или более пептидных связей белка. Существует несколько подходов к проведению расщепления белка в образце с использованием подходящего гидролизующего средства, например, ферментативное расщепление или неферментативное расщепление.

Применяемый в данном документе термин "гидролизующее средство" относится к любому одному или комбинации большого числа различных средств, которые могут осуществлять расщепление белка. Неограничивающие примеры гидролизующих средств, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают трипсин, эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C, протеазу внешней мембраны T (OmpT), разрушающий иммуноглобулин фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназу и протеазу из *Aspergillus Saitoi*.

Неограничивающие примеры гидролизующих средств, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают применение высокой температуры, микроволн, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения, растворителей (неограничивающими примерами являются этанол и ацетонитрил), расщепления иммобилизованными ферментами (IMER), иммобилизованных на магнитных частицах ферментов и иммобилизованных внутри кристалла ферментов. Последний обзор с обсуждением доступных методик расщепления белка см. в Switazar et al., "Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments" (J. Proteome Research 2013, 12, 1067-1077). Один или комбинация гидролизующих средств может расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде специфическим для последовательности образом, создавая предсказуемую коллекцию более коротких пептидов.

В некоторых вариантах осуществления при расщеплении смеси обработанного или меченного изотопом осажденного образца и по меньшей мере части обработанного или меченного изотопом фильтрата можно осуществлять анализ посредством жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометром. Один такой иллюстративный вариант осуществления представлен на фиг. 2. На фиг. 2 показан иллюстративный вариант осуществления способа количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок - mAb1, и второй белок - слитый белок 1, в совместно составленном препарате, при этом указанный способ включает иммобилизацию антитела, специфического к первому белку (антитело к mAb1) на твердой поверхности, инкубирование образца с указанным антителом, захват осажденного образца посредством удаления гетеродимера mAb1 и слитого белка 1, мономер mAb1 и димер mAb1, сбор фильтрата, содержащего мономер слитого белка 1 и димер слитого белка 1, обработку осажденного образца первым соединением - немеченным йодацетамидом (IAA), обработку фильтрата вторым соединением - меченным йодацетамидом (IAA), смешивание обработанного осажденного образца и около 10% обработанного фильтрата с образованием смеси, расщепление указанной смеси, и анализ смеси посредством жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометром для количественного определения гетеродимерных молекул в образце. В ходе количественного определения гетеродимерных молекул с использованием иллюстративного варианта осуществления может возникать неспецифическое связывание второго белка при инкубировании образца с указанным антителом. Такое неспецифическое связывание может обеспечивать завышение оценки количества гетеродимера. Следовательно, может быть получен отрицательный образец и может быть получено количество неспецифически связанного второго белка. Пример одной из таких возможностей показан на фиг. 3.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления отрицательный образец может включать мономеры и гомодимеры первого белка и второго белка, в отсутствие гетеродимерных молекул.

На фиг. 3 показан иллюстративный вариант осуществления для получения отрицательного образца. Он включает применение образца, содержащего мономеры и гомодимеры первого белка (mAb1) и второго белка (слитого белка 1). Данное количество второго белка, неспецифически связанного с антителом, можно количественно оценивать с использованием способа, включающего иммобилизацию антитела, специфического к первому белку (антитело к mAb1) на твердой поверхности, инкубирование образца с указанным антителом, захват осажденного образца посредством удаления неспецифически связанного слитого белка 1, мономера mAb1 и димера mAb1, сбор фильтрата, содержащего мономер и димер слитого белка 1, обработка осажденного образца первым соединением - немеченным йодацетамидом (IAA), обработка фильтрата вторым соединением - меченным йодацетамидом (IAA), смешивание обработанного осажденного образца и около 10% обработанного фильтрата с образованием смеси, и анализ смеси посредством жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометром для количественного определения гетеродимерных молекул в образце.

Иллюстративные варианты осуществления

В вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, представлены способы и система для идентификации и/или количественного определения димерных молекул.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления данного раскрытия представлен способ идентификации димерных молекул, включающий приведение образца, содержащего виды димеров, в контакт с хроматографической системой, содержащей смолу для хроматографии, промывание указанной смолы подвижной фазой с получением фильтрата, содержащего виды димеров, и идентификация димерных молекул в указанном элюенте с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления виды димеров могут представлять собой виды гомодимеров.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления виды димеров могут представлять собой виды гетеродимеров.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая система может включать традиционную обращеннофазовую (RP), ионообменную (IEX) или нормальнофазовую хроматографию (NP).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая смола может быть выбрана из аффинной смолы для хроматографии, анионообменной смолы, катионообменной смолы, аффинной смолы, смолы для хроматографии со смешанным режимом, смолы для хроматографии с гидрофобным взаимодействием или смолы для эксклюзионной хроматографии. В одном конкретном иллюстративном варианте осуществления хроматографическая смола может представлять собой смолу для эксклюзионной хроматографии.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может представлять собой нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может быть связан онлайн с хроматографической системой, содержащей смолу для хроматографии.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может быть запущен в неденатурирующих условиях.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая система может быть связана с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая система может быть связана с ультрафиолетовым детектором с использованием делителя потока меньшей мере с тремя путями.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая система может быть связана с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением и ультрафиолетовым детектором с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая система может быть связана с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением и ультрафиолетовым детектором с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями, причем масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением представляет собой нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая система может быть связана с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением и ультрафиолетовым детектором с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями, причем масс-спектрометр может представлять собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, работающий в неденатурирующих условиях.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая система может быть связана с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением и ультрафиолетовым детектором с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями, причем масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может представлять собой нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, работающий в неденатурирующих условиях.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления элюент, содержащий белок или комплекс антиген-антитело или соъюгат антитело-лекарственное средство от промывки смолы, можно вводить в ультрафиолетовый детектор посредством по меньшей мере одного делителя потока по меньшей мере с тремя путями со скоростью потока от около 0,2 мл/мин. до около 0,4 мл/мин.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления подвижная фаза для промывки может иметь скорость потока от около 0,2 мл/мин. до около 0,4 мл/мин.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления подвижная фаза может включать летучую соль. В некоторых конкретных вариантах осуществления подвижная фаза может включать ацетат аммония, бикарбонат аммония или формиат аммония, или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления применяемая подвижная фаза может быть совместима с масс-спектрометром.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления образец может включать около 10 мкг до около 100 мкг димерных молекул.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления скорость потока в масс-спектрометре с ионизацией электрораспылением может составлять от около 10 нл/мин. до около 50 нл/мин.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может иметь напряжение при распылении от около 0,8 кВ до около 1,5 кВ.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления идентификация может включать секвенирование белка, секвенирование белка *de novo*, идентификация посттрансляционных модификаций или сравнительный анализ, или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления образец также может содержать мономер белков.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления димер может включать первый белок и второй белок, причем первый белок и второй белок может представлять собой терапевтическое антитело,

антитело, моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, слитый белок или их комбинации. В одном аспекте фрагмент антитела может включать фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, димер dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и выделенную определяющую комплементарность область (CDR), триатела, тетратела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антитела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антитела.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления виды димеров могут представлять собой связанную с продуктом примесь, присутствующую в совместно составленном препарате.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления димер может включать первый белок и второй белок, причем первый белок и второй белок может характеризоваться pI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном аспекте белок может характеризоваться pI около 4,5, около 5,0, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1, около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9, около 8,0, около 8,1, около 8,2, около 8,3, около 8,4, около 8,5, около 8,6, около 8,7, около 8,8, около 8,9 или около 9,0.

Следует понимать, что способы не ограничены каким-либо указанным выше белком, примесью и колонкой, и что способы идентификации или количественного определения могут осуществляться посредством любых подходящих средств.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления настоящего раскрытия представлена система, содержащая хроматографическую колонку 100, содержащую смолу для хроматографии, причем хроматографическая колонка может иметь возможность получать подвижную фазу и образец, содержащий белок, и масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением 110 (см. фиг. 1).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая колонка 100 может содержать смолу, выбранную из смолы для хроматографии с гидрофобным взаимодействием, анионообменной смолы, анионообменной смолы, аффинной смолы для хроматографии, смолы для эксклюзионной хроматографии, смола для хроматографии со смешанным режимом, или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением 110 может иметь возможность связывания с указанной хроматографической колонкой 100.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением 110 может иметь возможность запуска в неденатурирующих условиях.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением 110 может представлять собой нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением 110 может представлять собой нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, работающий в неденатурирующих условиях.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая колонка 100 может иметь возможность связывания с масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением 100 с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями 120.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая колонка 100 может иметь возможность связывания с ультрафиолетовым детектором 130 с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями 120.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления хроматографическая колонка 100 может иметь возможность связывания с ультрафиолетовым детектором 130 и масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением 110 с использованием делителя потока по меньшей мере с тремя путями 120.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления делитель потока 120 с тремя путями может иметь возможность непропорционально разделены для обеспечения потока из хроматографической колонки 100 на ультрафиолетовый детектор 130 и масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением 110.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления система может быть способна идентифицировать виды димеров.

Иллюстративный вариант осуществления системы изображен на фиг. 1. Делитель потока после колонки по меньшей мере с тремя путями применяют для обеспечения двойного детектирования УФ/MS. Небольшая объемная фракция может быть направлена в MS, а большая объемная фракция - в УФ-детектор. Обнаружение практически занимает то же время удерживания. Фракции УФ-детектора могут быть собраны для извлечения образца.

Следует понимать, что система не ограничена каким-либо из указанных выше белков, хроматографической колонкой, масс-спектрометром, конъюгатом антитело-лекарственное средство, комплексом антиген-антитело.

В настоящем раскрытии, по меньшей мере в его части, представлен способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце, содержащем первый белок и второй белок, при этом

указанный способ включает иммобилизацию антитела, специфического к первому белку, на твердой поверхности, инкубацию образца указанным антителом, захват осажденного образца, сбор элюата, обработка осажденного образца первым соединением, обработка элюата вторым соединением, смешивание обработанного осажденного образца и по меньшей мере части обработанного элюата с образованием смеси и анализ смеси с использованием жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометром для количественного определения гетеродимерных молекул в образце.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления первый белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело или моноклональное антитело Fc-слитого белка. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления первый белок может представлять собой моноклональное антитело.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления второй белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело или Fc-слитый белок. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления первый белок может представлять собой Fc-слитый белок.

В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий первый белок и второй белок, может дополнительно содержать виды, выбранные из гомодимерных молекул первого белка, гомодимерных молекул первого белка, гетеродимерных молекул первого белка и второго белка или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий первый белок и второй белок, может дополнительно содержать по меньшей мере еще один белок.

В некоторых вариантах осуществления твердая поверхность может быть выбрана из аффинных смол, магнитных гранул и покрытых пластин. Неограничивающие примеры аффинных смол включают агарозные гранулы белка А, агарозные гранулы белка G, сефарозные гранулы белка А и сефарозные гранулы белка G.

В некоторых вариантах осуществления магнитные гранулы могут иметь монослой рекомбинантного стрептавидина, ковалентно связанного с поверхностью.

В некоторых вариантах осуществления антитело, специфическое к первому белку на твердой поверхности, и образец может быть инкубирован в течение от нескольких минут до нескольких часов.

В некоторых вариантах осуществления осажденный образец может быть получен посредством центрифугирования. В некоторых конкретных вариантах осуществления элюент может быть получен посредством сбора супернатанта.

В некоторых вариантах осуществления осажденный образец может быть ресуспендирован посредством нагревания ресуспендированного осажденного образца.

В некоторых вариантах осуществления осажденный образец может быть ресуспендирован посредством нагревания ресуспендированного осажденного образца.

В некоторых вариантах осуществления осажденный образец может подвергаться элюированию.

В некоторых вариантах осуществления осажденный образец и элюент могут быть восстановлены посредством применения восстанавливающего средства. В некоторых конкретных вариантах осуществления восстанавливающее средство может представлять собой дитиотреитол.

В некоторых вариантах осуществления обработка может включать алкилирование.

В некоторых вариантах осуществления первое соединение и второе соединение могут представлять собой изотопы.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления по меньшей мере часть обработанного фильтрата может включать около 10% обработанного фильтрата. В одном аспекте по меньшей мере часть обработанного фильтрата может составлять около 1%, около 2%, около 3%, около 4%, около 5%, около 6%, около 7%, около 8%, около 9%, около 10%, около 15%, около 20%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления первое соединение и второе соединение могут быть мечеными йодацетамидом и немечеными йодацетамидом соответственно. В некоторых других иллюстративных вариантах осуществления первое соединение и второе соединение могут быть немечеными йодацетамидом и мечеными йодацетамидом соответственно.

В некоторых вариантах осуществления смесь может расщепляться перед анализом с использованием жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометром. В одном аспекте смесь может расщепляться с использованием гидролизующего средства, выбранного из трипсина, эндопротеиназы Arg-C, эндопротеиназы Asp-N, эндопротеиназы Glu-C, протеазы наружной мембраны T (OmpT), разрушающий иммуноглобулин фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), разрушающий иммуноглобулин фермент *Aspergillus Saitoi*.

В некоторых вариантах осуществления смесь может расщепляться с использованием трипсина.

В некоторых вариантах осуществления смесь может быть дегликозилирована перед анализом с использованием жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометром.

Пример одного иллюстративного варианта осуществления представлен на фиг. 4. Как показано на фиг. 4 смесь можно расщепить, а затем разделить пополам. Одну половину можно анализировать

соединением, а фильтрата вторым соединением, смешивание обработанного осажденного образца и около 10% обработанного фильтрата с образованием смеси, и анализ смеси с использованием жидкостной хроматографии, связанной с масс-спектрометром для количественного определения гетеродимерных молекул в образце.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ количественного определения гетеродимерных молекул в образце может включать первый белок и второй белок, причем образец может находиться в стрессовых условиях посредством подвергания его условию, выбранному из группы, включающей воздействие холодного белого света, воздействие перекиси водорода, воздействие ультрафиолетового света, тепла или их комбинаций, включая ускоренное разложение в соответствии с руководящими принципами ICH.

В некоторых вариантах осуществления % гетеродимера второго белка в образце, содержащем первый белок и второй белок, причем первый белок обрабатывают немеченным соединением, а второй белок обрабатывают меченным соединением, можно рассчитать с использованием формулы, приведенной ниже:

$$\% \text{ гетеродимера второго белка} = \frac{\text{количество второго белка в виде гетеродимера}}{\text{общее количество второго белка}} = \frac{\text{легкая область}}{\text{легкая область} + \text{тяжелая область}},$$

где легкая область представляет собой площадь под кривой пиков MS, определенная для второго белка, обработанного немеченым соединением, а тяжелая область представляет собой площадь под кривой пиков MS, определенная для второго белка, обработанного меченым соединением. Способ также может быть реализован таким образом, что первый белок обрабатывают меченым соединением, а второй белок обрабатывают немеченым соединением.

В некоторых вариантах осуществления % гетеродимера второго белка в образце, содержащем первый белок и второй белок, причем первый белок обрабатывают немеченым соединением, а второй белок обрабатывают меченым соединением, можно рассчитать с использованием формулы, приведенной ниже:

$$\% \text{ гетеродимера второго белка} = \frac{\text{количество второго белка в виде гетеродимера}}{\text{общее количество второго белка}} = \frac{\text{легкая область}}{\text{легкая область} + 10 \times (\text{тяжелая область})},$$

где легкая область представляет собой площадь под кривой пиков MS, определенная для второго белка, обработанного немеченым соединением, а тяжелая область представляет собой площадь под кривой пиков MS, определенная для второго белка, обработанного меченым соединением. Способ также может быть реализован таким образом, что первый белок обрабатывают меченым соединением, а второй белок обрабатывают немеченым соединением.

Последовательная маркировка этапов способов, предложенных в данном документе, номерами и/или буквами не подразумевает ограничения способа или каких-либо вариантов его осуществления конкретным указанным порядком.

В тексте описания цитируются различные публикации, включая патенты, патентные заявки, опубликованные патентные заявки, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из данных приведенных ссылок включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей.

Данное изобретение станет более понятно со ссылкой на следующие примеры, которые приведены для более подробного описания изобретения. Они предназначены для иллюстрации примеров и не должны восприниматься как ограничивающие объем изобретения.

Примеры

Материалы и реагенты.

Воду приобретали у Honeywell (Маскегон, Мичиган). Ацетат аммония приобретали у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури). 1 М трис-HCl, pH 7,5 приобретали у Teknova (Холлистер, Калифорния). Трубки из плавленого кварца (внутренний диаметр (ID) 150 мкм, внешний диаметр (OD) 360 мкм), трехходовой соединитель и гильзу приобретали у IDEX (Ок Харбор, Вашингтон). Наконечник PicoTip EMITTER SilicaTip (FS360-20-10-D-20-7CT) приобретали у New Objective (Вобурн, Массачусетс). Колонку ACQUITY UPLC Protein BEH SEC, 200 Å, 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм приобретали у Waters (Милфорд, Массачусетс). Нагреватель колонки с горячим карманом приобретали у Thermo-Fisher (Уолтем, Массачусетс). Все реагенты применяли без дополнительной очистки.

Анализ посредством онлайн SEC-нано-ESI-MS.

Система ACQUITY UPLC I класса (Waters, Милфорд, Массачусетс) была связана с масс-спектрометром Q Exactive HF hybrid quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, Бремен, Германия) для всех анализов посредством SEC-нано-ESI-MS. Колонку ACQUITY UPLC Protein BEH SEC (200Å, 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм) устанавливали при 30°C и применяли для разделения mAb и ADC. Подвижная фаза составляла 100 mM ацетата аммония с pH 6,8. Каждое разделение занимало 30 мин со скоростью потока 0,3 мл/мин., и объем впрыска устанавливали на 40 мкг. Делитель потока с тремя путями (Т-образный делитель потока) подключали после колонки SEC. Трубки из плавленого кварца (L: 140 см, ID: 150 мкм) и наконечник из силикона (L: 5 см, ID: 10 мкм) подключали к Т-образному делителю потока. Фракцию большого объема передавали в УФ-детектор через трубку из плавленого кварца, тогда как фракцию

малого объема отводили в MS через наконечник из силикона. Следующие параметры MS применяли для онлайн-сбора данных SEC-нано-ESI-MS. Каждое получение данных длилось 25 мин, начиная сразу после введения образца. Образцы ионизировали в положительном режиме с напряжением распыления 3 кВ, температурой капилляра 200°C и уровнем RF 70 S-линзы. Внутренний CID устанавливали на 75 эВ. Полное сканирование MS было получено при разрешающей способности 15 К с диапазоном масс масса/заряд 2000-8000. Для полного сканирования MS применяли максимальное время впрыска 100 мс, целевое значение автоматической регулировки усиления 3е6 и 10 микросканов.

Анализ данных. Для деконволюции исходных данных применяли программное обеспечение Protein Metrics Intact Mass. Для анализа экстракционной ионной хроматограммы применяли браузер Thermo Xcalibur Qual. Для расчета DAR ADC применяли Microsoft Excel.

Пример 1.

1.1. Инструменты для онлайн SEC-нано-ESI-MS.

Технологии SEC и MS обычно применяют для характеристики образцов белков. SEC обеспечивает выделение и характеристику белков в условиях, которые сводят к минимуму изменения белковой структуры, тогда как MS обеспечивает идентификацию отдельных компонентов в комплексных образцах. Комбинирование отдельных возможностей SEC и MS в единую платформу было бы весьма желательным, но это оказалось сложной задачей, поскольку высокая скорость потока и нелетучая соль, применяемые для анализа SEC, несовместимы с исходной MS. Для преодоления данного ограничения осуществляли снижение поступления растворителя и соли в MS за счет разделения потока элюата из SEC с использованием Т-образного делителя потока после колонки (см. фиг. 1). Затем Т-образный делитель потока подключали к MS посредством наконечника из силикона и, параллельно, к УФ-детектору посредством трубки из плавленого кварца. Такая компоновка позволяла проводить одновременное двойное УФ/MS детектирование элюатов SEC. Изменяя длину и диаметр трубки из плавленого кварца, можно регулировать скорость потока к MS через наконечник из силикона (например, более длинные/узкие трубки могут создавать более высокое сопротивление, вызывая повышенный поток в наконечнике из силикона и MS). Образцы белка разделяли посредством колонки 4,6 мм SEC с использованием скорости потока 0,3 мл/мин. Трубка из плавленого кварца, соединяющую Т-образный делитель потока и УФ-детектор длиной 140 см и внутренним диаметром 150 мкм, обеспечивала необходимую скорость потока ~1 мкл/мин. в наконечнике из силикона. Длина и диаметр трубки из плавленого кварца также обеспечивает почти синхронное обнаружение молекул посредством УФ и MS.

1.2. Совместно составленный препарат.

Для эксперимента применяли состав, содержащий mAb1, mAb2 и mAb3. В составе возможно может присутствовать шесть димерных молекул (см. фиг. 5). Образцы подвергали различным стрессовым условиям, включая условия, представленные в руководящих принципах ICH, например, испытание фотостабильности (UV 1xICH и CW 1xICH).

1.3. Результаты.

Пять димеров (mAb1-mAb1, mAb1-mAb2, mAb2-mAb2, mAb2-mAb3 и mAb3-mAb3) успешно дифференцировали с использованием системы, проиллюстрированной в п. 1.1, с использованием как экстракционных ионных хроматограмм (XIC), так и измерения молекулярного веса, как показано на фиг. 6 и 7. Единственный неидентифицированный гетеродимер был mAb1-mAb3, поскольку его молекулярный вес был очень близок к весу гомодимера mAb2-mAb2 (отличался на 15 Да) (см. фиг. 7).

Пример 2.

2.1. Инструменты для онлайн SEC-нано-ESI-MS.

Применяли инструменты, показанные в п.1.1.

2.2. Совместно составленный препарат.

Для эксперимента применяли состав, содержащий mAb1 и слитый белок. В составе возможно может присутствовать три вида димеров (см. фиг. 8). Наличие N-гликанов в слитом белке значительно усложняет анализ интактной массы.

Совместный состав, содержащий mAb1 и слитый белок в соотношении 120:40, совместный состав, содержащий mAb1 и слитый белок в соотношении 60:40, состав mAb1 (120 мг/мл), состав mAb1 (60 мг/мл), и состав слитого белка (40 мг/мл) подвергали четырем стрессовым условиям: (а) холодный белый свет (CW), (b) пероксид водорода в течение 18 ч, (с) ультрафиолетовый свет (УФ), и (d) нагревание при 37°C в течение 28 ч. Стрессовые условия включали условия, представленные в руководящих принципах ICH.

Составы и совместные составы, подвергнутые нагреву при 37°C в течение 28 ч и обработке пероксидом водорода в течение 18 ч, обеспечивали незначительное повышение молекул с высоким молекулярным весом (димеры или другие агрегаты). Напротив, составы и совместные составы, подвергнутые обработке холодным белым светом и ультрафиолетом, содержат высокие уровни молекул с высоким молекулярным весом.

2.3 Идентификация димерных молекул.

Совместный состав, содержащий mAb1 и слитый белок в соотношении 120:40, подвергнутый воздействию холодного белого света, анализировали с использованием системы, проиллюстрированной

на 1.1. На фиг. 9 показана экстракционная ионная хроматограмма (XIC) совместного состава, анализированного посредством SEC-нано-ESI-MS. Способ обеспечивает дифференциацию мономерных молекул и димерных молекул.

Применение способа уменьшения заряда значительно улучшило измерение массы белкового ингредиента, который был значительно гетерогенным по молекулярной массе, как показано на фиг. 10.

Разработана онлайн-платформа SEC-нано-ионизация электрораспылением (нано-ESI) -MS с двойным ультрафиолетовым (УФ) и MS-детектированием. Пригодность данной платформы была подтверждена посредством идентификации гомодимерных и гетеродимерных молекул в совместно составленном препарате.

Делитель потока с тремя путями применяли для непропорционального разделения элюатов SEC на MS и УФ-детектор, при этом низкообъемная фракция направляется в MS, а высокообъемная фракция в УФ-детектор. Текущая платформа обеспечивает возможность дополнительного двойного обнаружения посредством УФ и нативного MS с возможностью сбора фракций и может применяться для характеристики димерных молекул. Дальнейшие модификации данной онлайн SEC-нано-ESI-MS, такие как изменение химического состава колонки или применение прибора Q Exactive UHMR, позволят адаптировать ее для других вариантов применения, таких как анализ вариантов заряда или очень больших белковых комплексов. Описанный в данном документе способ открыл возможность комбинирования методик высокой сепарации солей (например, HIC, WCX) с обнаружением на основе масс-спектрометрии. В заключение, онлайн SEC-нано-ESI-MS может широко применяться для анализа биофармацевтических препаратов белка для различных вариантов применения.

Пример 3.

3.1. Получение образца.

Применяли совместный состав, содержащий mAb1 и слитый белок 1. Различные образцы (50 мкл), применяемые в эксперименте, показаны в табл. 1. Отрицательный контроль (образец 3) получали посредством смешивания слитого белка 1 в стрессовых условиях (образец 1) и mAb1 в стрессовых условиях (образец 1) непосредственно перед анализом, причем образцы подвергали стрессовым условиям ультрафиолетового света, как указано в руководящих принципах ICH. Другой отрицательный контроль (образец 7) получали посредством смешивания слитого белка 1 в стрессовых условиях (образец 6) и mAb1 в стрессовых условиях (образец 5) непосредственно перед анализом, причем образцы подвергали стрессовым условиям с использованием холодного белого света, как указано в руководящих принципах ICH.

Таблица 1

	Образцы (стрессовые условия)	Конц. Информация	% мономера mAb1	% мономера слитого белка 1	Общий % мономера	% HMW	% LMW
1	mAb1 (УФ)	mAb1 (120 мг/мл)	80,25	Н/Д	80,25	18,51	1,24
2	слитый белок 1 (УФ)	слитый белок 1 (40 мг/мл)	Н/Д	81,03	81,03	18,97	0
3	Отрицательный контроль (УФ)	Смесь двух приведенных выше компонентов					
4	mAb1+слитый белок 1 (УФ)	120:40, mAb1:слитый белок 1	67,64	14,75	82,39	16,63	0,98
5	mAb1 (CW)	mAb1 (120 мг/мл)	73,75	Н/Д	73,75	24,91	1,33
6	слитый белок 1 (CW)	слитый белок 1 (40 мг/мл)	Н/Д	81,78	81,78	18,23	0
7	Отрицательный контроль (CW)	Смесь двух приведенных выше компонентов					
8	mAb1+слитый белок 1 (CW)	120:40, mAb1:слитый белок 1	62,01	12,87	74,88	24,15	0,99

3.2. Иммунопреципитация.

Иммунопреципитацию осуществляли, как показано на фиг. 11. В шесть пробирок для центрифугирования добавляли 0,5 мл Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (магнитные гранулы) и 100 мкг антитела к mAb1. Образцы 1, 2, 4, 5, 6 и 8 добавляли в отдельные пробирки и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре посредством аккуратного перемешивания в подходящем смесителе. Пробирки помещали на магнитную подставку на 3 мин для обеспечения сбора всех гранул. Супернатант удаляли и добавляли 0,4 мл 100 мМ буфера на основе ацетата аммония. Пробирки инкубировали в течение 5 мин на Thermomixer со скоростью 800 об/мин. Данную стадию повторяли дважды (всего 3 раза). Весь супернатант, 1,2 мл супернатанта, собирали в 1,5 мл пробирку (и маркировали как FT1-

элюент). Магнитные гранулы промывали 0,4 мл 10% ацетонитрила с использованием Thermomixer со скоростью 800 об/мин. Гранулы помещали на магнитную подставку на 3 мин для обеспечения сбора всех гранул. Супернатант удаляли между промывками. Данную стадию повторяли трижды (всего 4 раза). Собирали весь супернатант - 1,2 мл супернатанта. В 1,5 мл пробирку, маркированную как FT2; добавляли 0,2 мл буфера для элюирования (50% ACN, 0,1% муравьиной кислоты) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин на Thermomixer со скоростью 1000 об/мин. Весь супернатант собирали в пробирку, помеченную как PD-удаление.

3.3. Анализ.

Анализ образца включал следующие стадии: добавление 20 мкл 8 М мочевины в 100 мМ трис-HCl (pH 7,5) в каждую пробирку с образцом. Добавить 1 мкл 100 мМ дитиотреитола (DTT) в воде Milli-Q к каждому образцу, встряхивание для хорошего перемешивания, и инкубирование при 50°C в течение 30 мин. После инкубирования добавление 1,1 мкл 200 мМ легкого йодацетамида (легкого IAA) в воде Milli-Q и добавление 1,1 мкл 200 мМ йодацетамида (тяжелого IAA) в воде Milli-Q в элюент. Инкубирование и удаленное вещества, и фильтрата при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин. Последующее смешивание всего раствора и около 10% фильтрата и расщепление посредством добавления 4 мкг трипсина и инкубирование в течение ночи при 37°C. Анализ расщепленной смеси посредством LC-MS (системы Waters ACQUITY UPLC и масс-спектрометра Thermo Q Exactive).

На фиг. 12 показаны отношения массы к заряду удаленного вещества и фильтрата, полученных для образцов 7 и 8. Удаленная фракция содержит слитый белок 1 в гетеродимере, а фракция фильтрата содержит слитый белок 1, присутствующий в мономере и гомодимере. На фиг. 13 показано рассчитанное процентное отношение гетеродимера слитого белка 1. Расчет проводили по формуле, показанной на фиг. 4. Для некоторых пептидов, применяемых для количественного определения слитого белка 1, диаграммы отношения массы к заряду в образцах 3,4, 7 и 8 показаны на фиг. 14-17. Пептид 1, пептид 2, пептид 3 и пептид 4 на фигурах представляет собой пептид ²⁵ELVIPCR³¹, пептид ⁷³EIGLLTCEATVNGHLYK⁸⁹, пептид ¹²⁰LVLNCTAR¹²⁷, и пептид ¹⁷⁸SDQGLYTCAASSGLMTK¹⁹⁴ соответственно.

% гетеродимера слитого белка 1 преобразовывали в % гетеродимер посредством следующего способа, показанного на фиг. 18. На основании расчетов для % гетеродимера, представленных на фиг. 18, % гетеродимера в образце 4 и образце 8 составил 6,4% и 8,5% соответственно. Низкие уровни "сигнала гетеродимера" из образцов отрицательного контроля (образцы 3 и 7) можно объяснить взаимодействием между mAb1 и слитым белком 1 после смешивания и неспецифическим взаимодействием между mAb1 и аффинной смолой. % гетеродимера соответствовал общему % HMW.

Пример 4.

Для оценки количественного определения предела и линейности гетеродимера слитого белка посредством иммунопреципитации применяли образцы с последовательно разведенным совместно составленным препаратом, подвергнутым стрессовым условиям холодного белого света.

Испытываемые образцы получали, как показано в табл. 2. Применяли совместный состав, содержащий mAb1 и слитый белок 1, и подвергали стрессовым условиям с использованием холодного белого света. Смешанный образец отрицательного контроля получали посредством смешивания слитого белка 1 в стрессовых условиях (образец 6) и mAb1 в стрессовых условиях (образец 5) непосредственно перед анализом. Различные образцы для испытания, применяемые для эксперимента, получали, как показано в табл. 2.

Таблица 2

	Испытываемый образец	Смешанные растворы	
		Совместно составленный образец (мкл)	Смешанный отрицательного контроля образец (мкл)
1	Совместно составленный CW-1	20	0
2	Совместно составленный CW-1/2	10	10
3	Совместно составленный CW-1/4	5	15
4	Совместно составленный CW-1/8	2,5	17,5
5	Совместно составленный CW-1/16	1,25	18,75
6	Отрицательный контроль	0	20

Иммунопреципитацию и анализ осуществляли, как показано в пп.3.2 и 3.3. График % гетеродимера слитого белка в испытываемых образцах, приведенный к % гетеродимера слитого белка в испытываемом образце без разбавления, показан на фиг. 19. Кроме того, график зависимости % гетеродимера слитого белка от % образца в стрессовых условиях холодного белого света в смешанном образце показан на фиг. 20 для трех пептидов, применяемых для количественного определения слитого белка 1, причем образец в

разведении 1 представляет собой беспримесный совместно составленный образец в стрессовых условиях холодного белого света. Способ количественного определения поддерживал достаточную линейность по меньшей мере не более 0,8% гетеродимера (наинизшее испытываемое значение).

Пример 5.

Для оценки количественного определения гетеродимера совместно составленных образцов в стрессовых условиях окружающей среды, образцы из совместно составленного препарата, содержащий mAb1 и слитый белок 1, хранили при 25°C в течение 12 месяцев и 5°C в течение 46 месяцев. Иммунопреципитацию и анализ осуществляли, как показано в пп.3.2 и 3.3. Количественное определение, вычисленное для образцов, показано в табл. 3 и на фиг. 21, в котором для количественного определения применяли различные пептиды слитого белка 1.

Таблица 3

Количественное определение	25□ 12 мес.	5□ 46 мес.	Mix-CW (Отрицательный контроль)
ELVIPCR	5,10%	3,38%	0,40%
SDQGLYTCAASSGLMTK	5,18%	3,56%	0,36%
EIGLLTCEATVNGHLYK	4,89%	3,47%	0,44%
Средний % гетеродимера	5,06%	3,47%	0,40%
% гетеродимера (рассчитанный) В пиковых областях УФ	2,78%	1,91%	0,22%
% HMW	6,40%	5,26%	

Таким образом, был разработан новый способ иммунопреципитации для количественного определения уровня гетеродимера в образцах, полученных из совместно составленных препаратов. Его успешно применяли для количественного определения уровня гетеродимера как в образцах, подвергнутых стрессовым условиям УФ/CW, так и в образцах, подвергнутых стрессовым условиям окружающей среды, полученных из совместно составленных препаратов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система идентификации по меньшей мере одного вида гетеродимеров первого белка и второго белка в совместно составленном препарате по меньшей мере двух белков, содержащем указанный первый белок и указанный второй белок, содержащая

хроматографическую колонку, содержащую смолу для эксклюзионной хроматографии, где указанная хроматографическая колонка сконфигурирована для возможности анализа образца, содержащего совместно составленный препарат по меньшей мере двух белков, включающий виды гетеродимеров, методом эксклюзионной хроматографии, и

масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, причем указанный масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением связан онлайн с указанной хроматографической колонкой для обеспечения сообщения жидкостей между указанным масс-спектрометром и указанной хроматографической колонкой и указанный масс-спектрометр способен к ионизации электрораспылением образца в условиях, которые не приводят к денатурации белков в указанном образце,

где по меньшей мере один делитель потока по меньшей мере с тремя путями используется для связывания указанной хроматографической колонки с указанным масс-спектрометром и с ультрафиолетовым детектором.

2. Система по п.1, в которой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением представляет собой нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

3. Способ идентификации по меньшей мере одного вида гетеродимеров первого белка и второго белка в совместно составленном препарате по меньшей мере двух белков, содержащем указанный первый белок и указанный второй белок, где указанный способ включает

приведение в контакт образца, содержащего совместно составленный препарат по меньшей мере двух белков, включая виды гетеродимеров, с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии;

промывку указанной смолы для эксклюзионной хроматографии с применением подвижной фазы с получением элюента, содержащего по меньшей мере один вид гетеродимеров; и

идентификацию указанного по меньшей мере одного вида гетеродимеров в указанном элюенте с использованием масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением в условиях, которые не приводят к денатурации белков,

где указанная хроматографическая система сконфигурирована онлайн с указанным масс-спектрометром для обеспечения сообщения жидкостей между указанным масс-спектрометром и указанной хроматографической колонкой, где по меньшей мере один делитель потока по меньшей мере с тремя

путями используется для связывания указанной хроматографической системы с указанным масс-спектрометром и с ультрафиолетовым детектором.

4. Способ по п.3, в котором масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением представляет собой нано-масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением.

5. Способ по п.3, в котором элюент от промывки смолы для эксклюзионной хроматографии вводят в ультрафиолетовый детектор посредством по меньшей мере одного делителя потока со скоростью потока между около 0,2 и около 0,4 мл/мин.

6. Способ по п.3, в котором подвижная фаза, применяемая для промывки смолы для эксклюзионной хроматографии, содержит ацетат аммония.

7. Способ по п.3, в котором подвижная фаза, применяемая для промывки смолы для эксклюзионной хроматографии, имеет pH около 6,8.

8. Способ по п.3, в котором подвижная фаза, применяемая для промывки смолы для эксклюзионной хроматографии, имеет скорость потока между около 0,2 и около 0,4 мл/мин.

9. Способ по п.3, в котором количество образца, содержащего виды димеров, приведенного в контакт с хроматографической системой, составляет между около 10 и около 100 мкг.

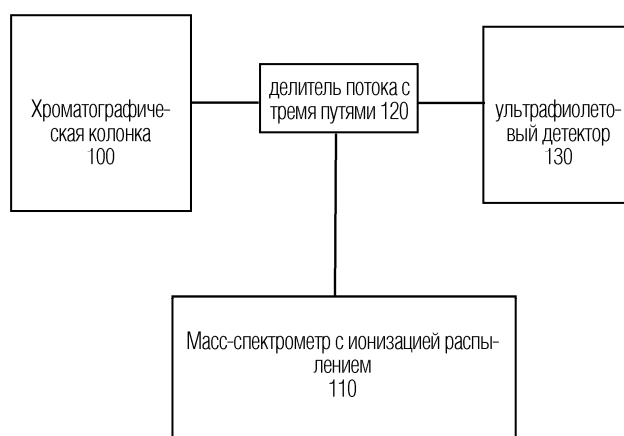
10. Способ по п.3, в котором элюент, полученный после промывки смолы для эксклюзионной хроматографии, вводят в масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, причем скорость потока электрораспыления от ионизации электрораспылением составляет между около 10 и около 50 нл/мин.

11. Способ по п.3, где напряжение распыления указанного масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением составляет между около 0,8 и около 1,5 кВ.

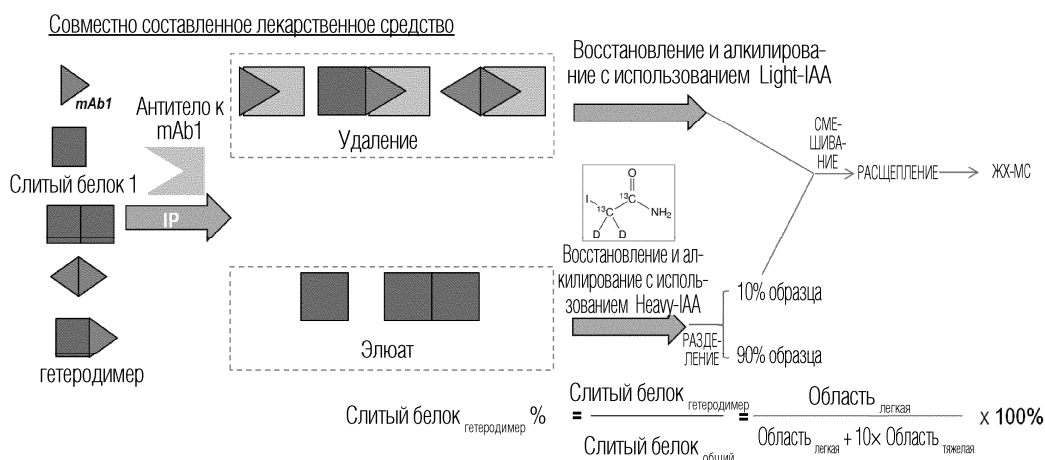
12. Способ по п.3, в котором образец содержит по меньшей мере два вида димеров.

13. Способ по п.3, в котором образец содержит виды гомодимеров.

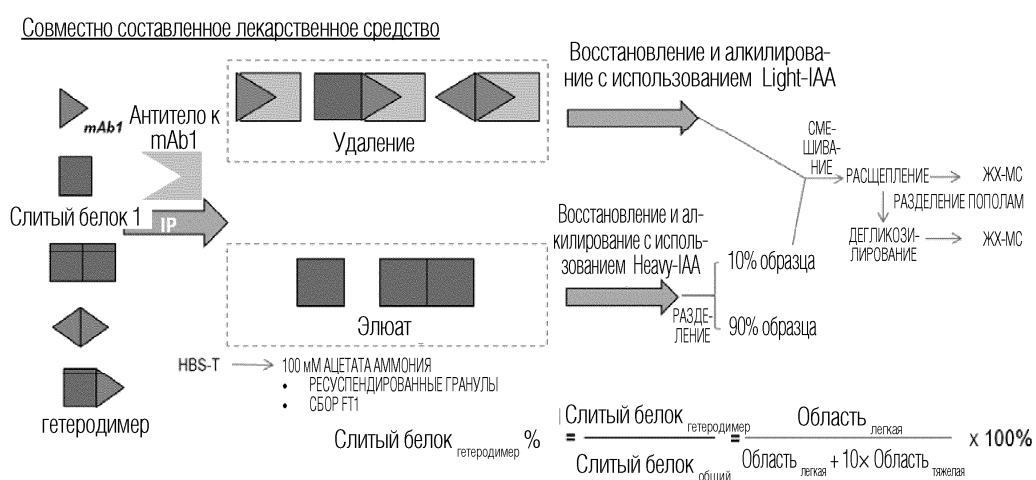
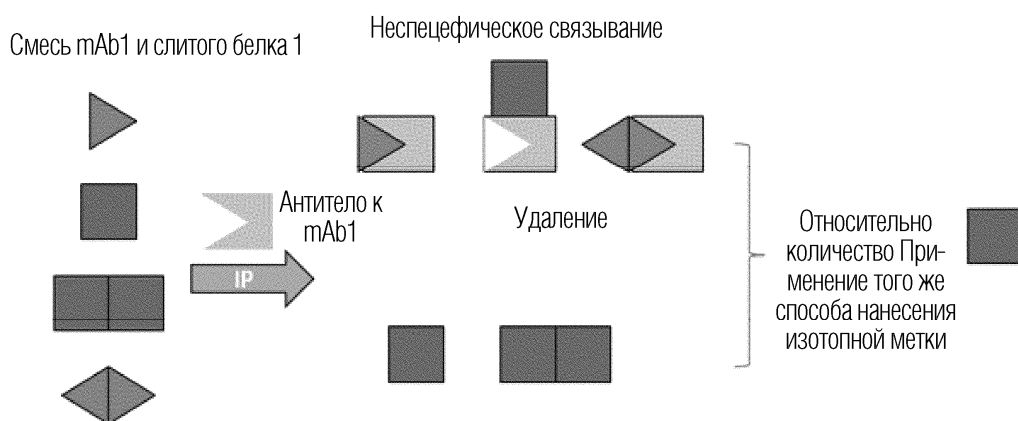
14. Способ по п.3, где указанный первый белок и указанный второй белок выбраны из группы, состоящей из терапевтического антитела, моноклонального антитела, поликлонального антитела, биспецифического антитела, фрагмента антитела, слитого белка и их комбинаций.



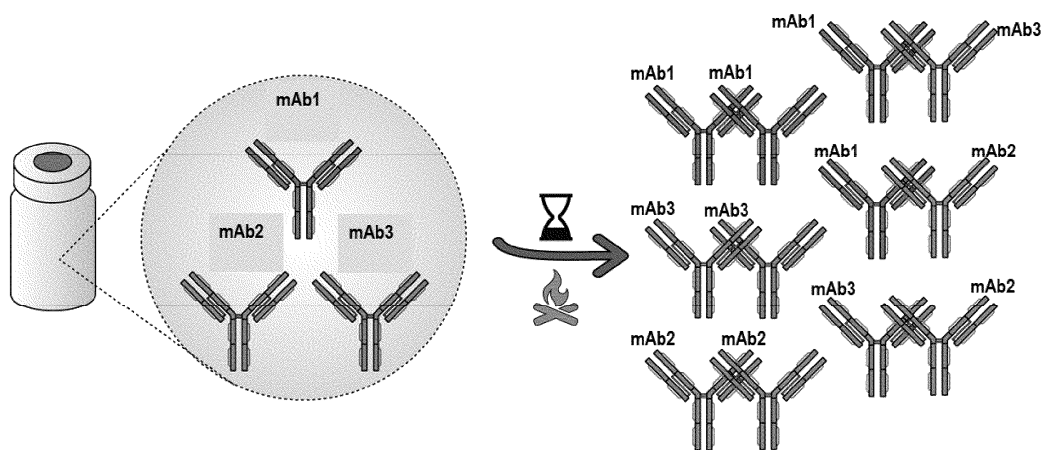
Фиг. 1



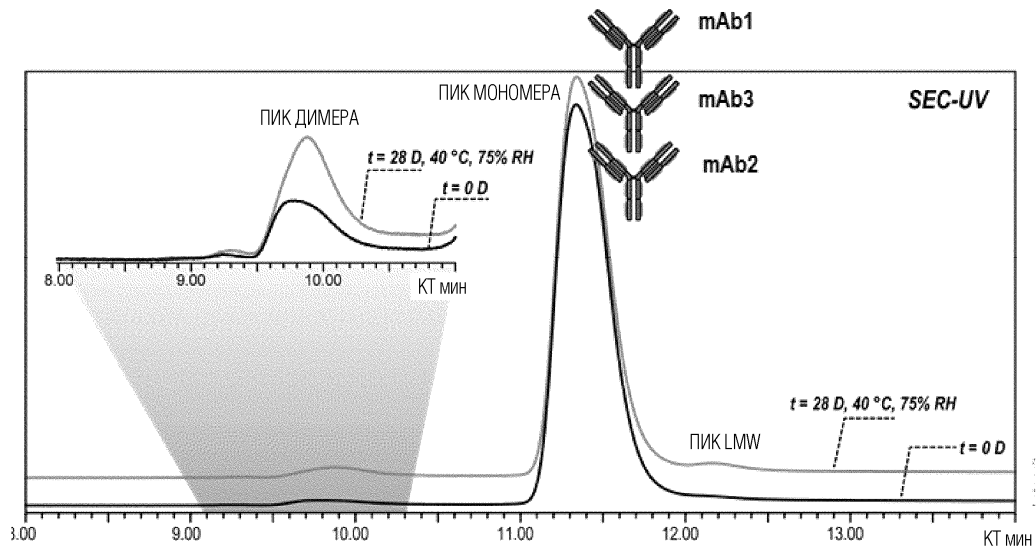
Фиг. 2



Фиг. 4

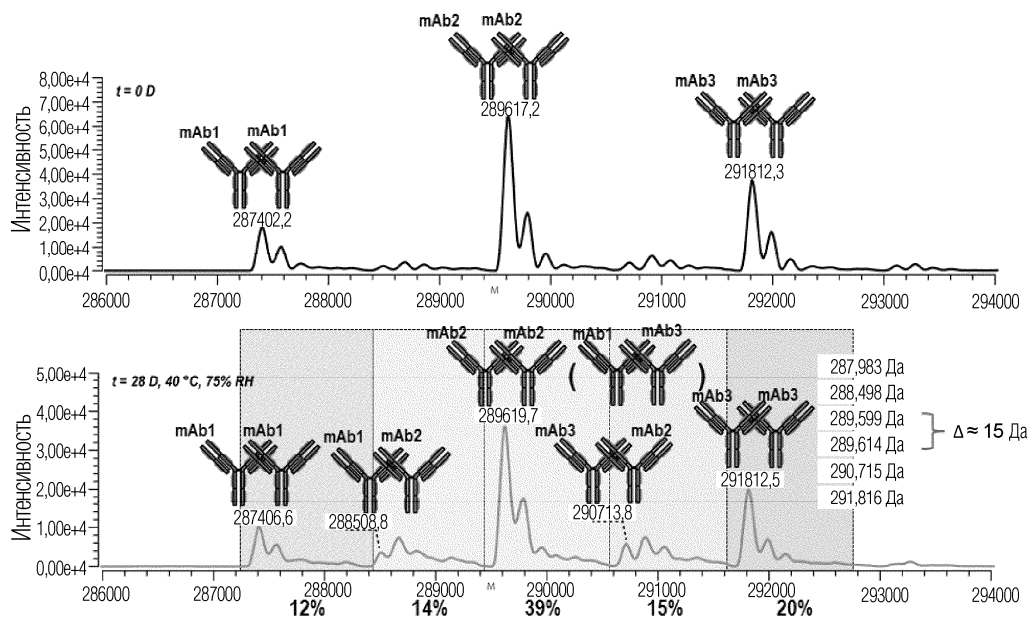


Фиг. 5

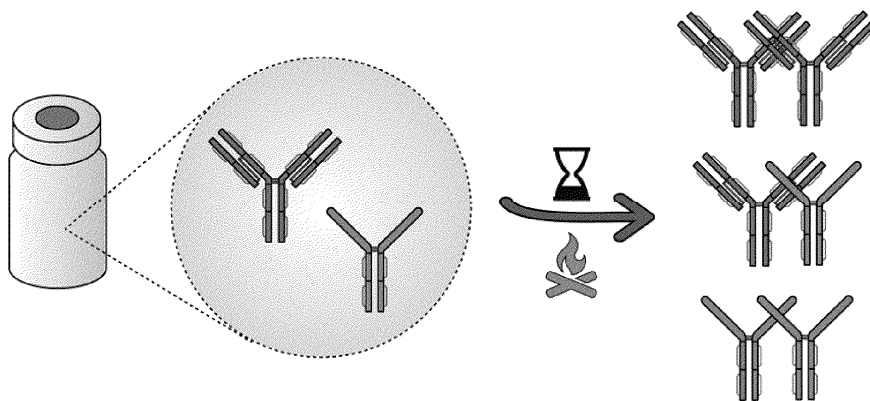


Образцы были гликозилированы в неденатурирующих условиях для удаления гетерогенности, обеспечиваемой Fc-N-гликанами

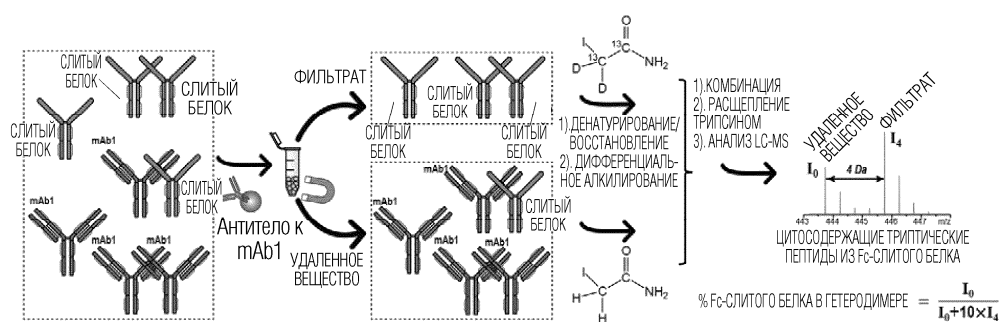
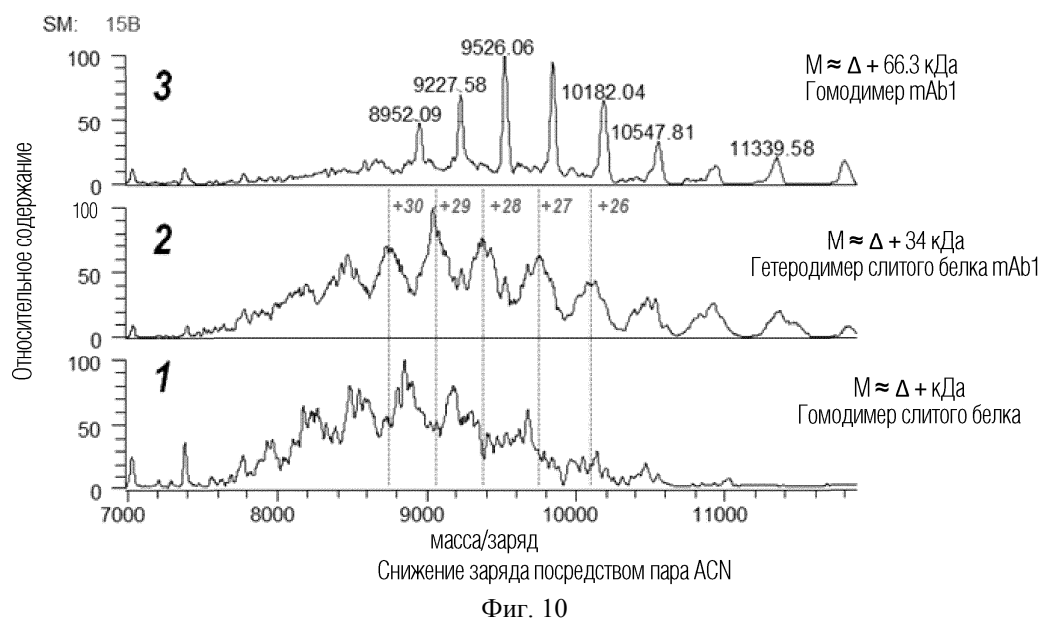
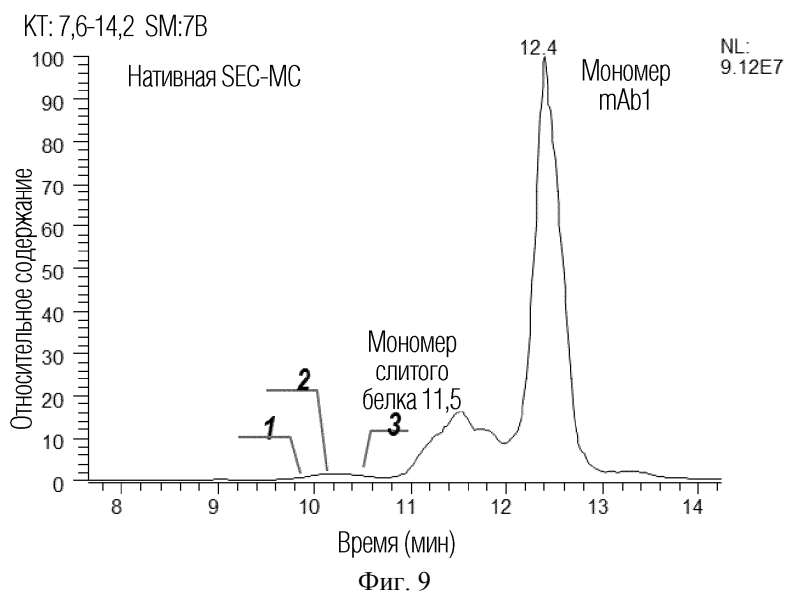
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

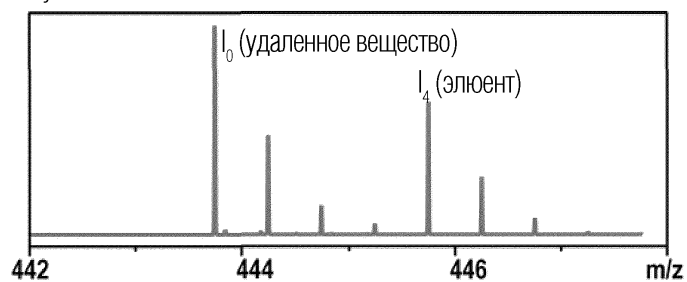


- ❖ Удаляемая фракция содержит Fc-слитый белок, присутствующий в гетеродимере
- ❖ Фракция элюента содержит Fc-слитый белок, присутствующий в мономере и гомодимере (применяли только 1/10 фракции элюента)

ФИГ. 11

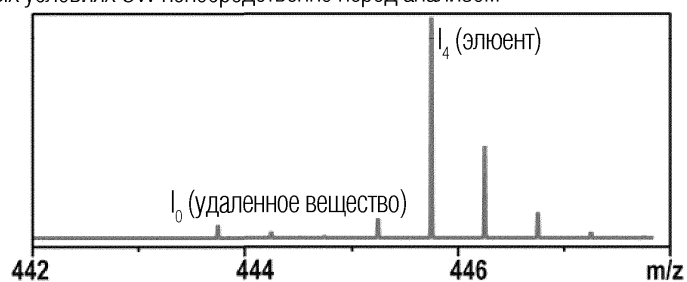
Образец 8

Совместно составленное белковое лекарственное средство в стрессовых условиях CW

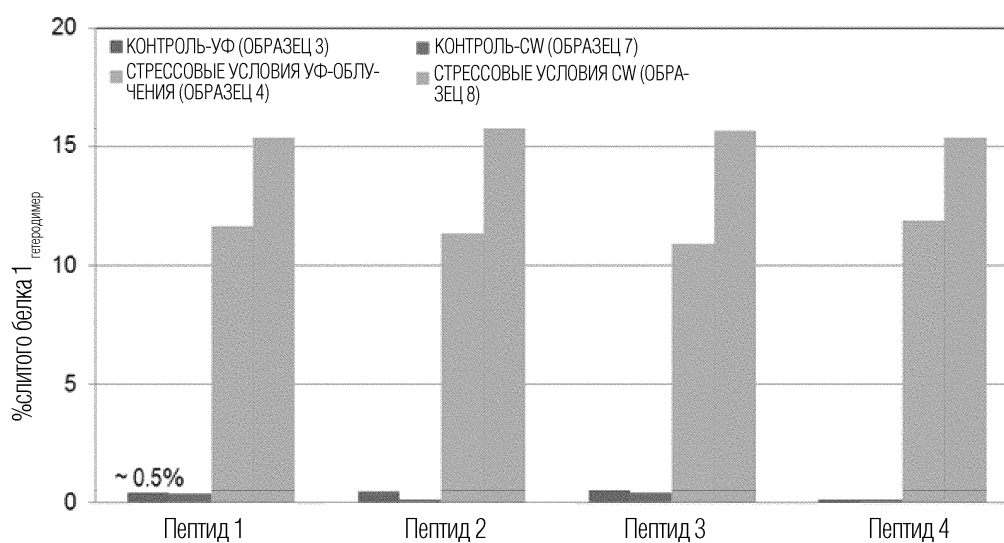


Образец 7

Отрицательный контроль: отдельное смешивание белков в стрессовых условиях CW непосредственно перед анализом



Фиг. 12



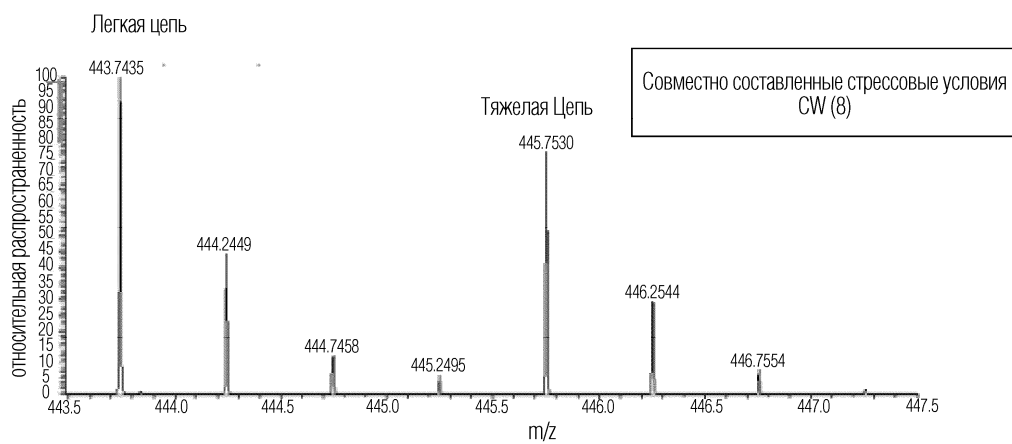
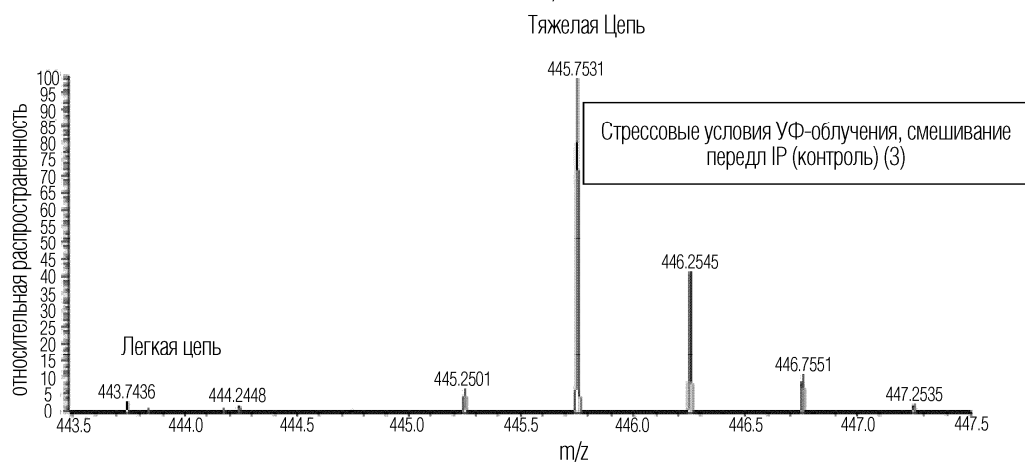
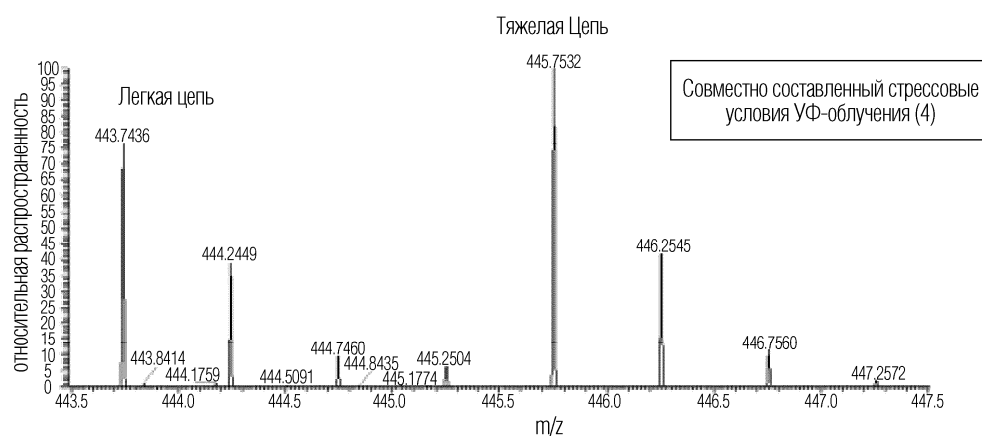
Применение различных пептидов слитого белка 1 для количественного определения

Фиг. 13

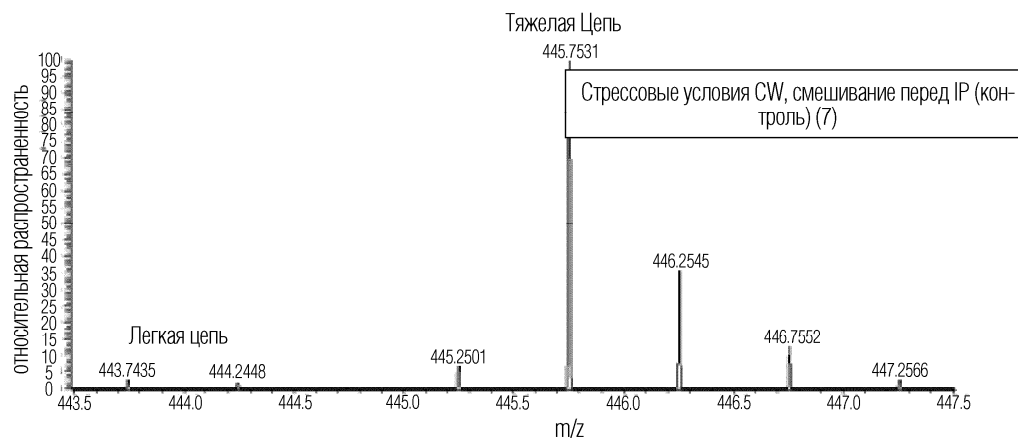
Пептид 1

Количественное определение гетеродимера

СПОСОБ СО СТРЕССОВЫМИ УСЛОВИЯМИ	UV (%)	CW(%)
СОВМЕСТНО СОСТАВЛЕННЫЙ	11.69	15.38
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ	0.43	0.38



044417

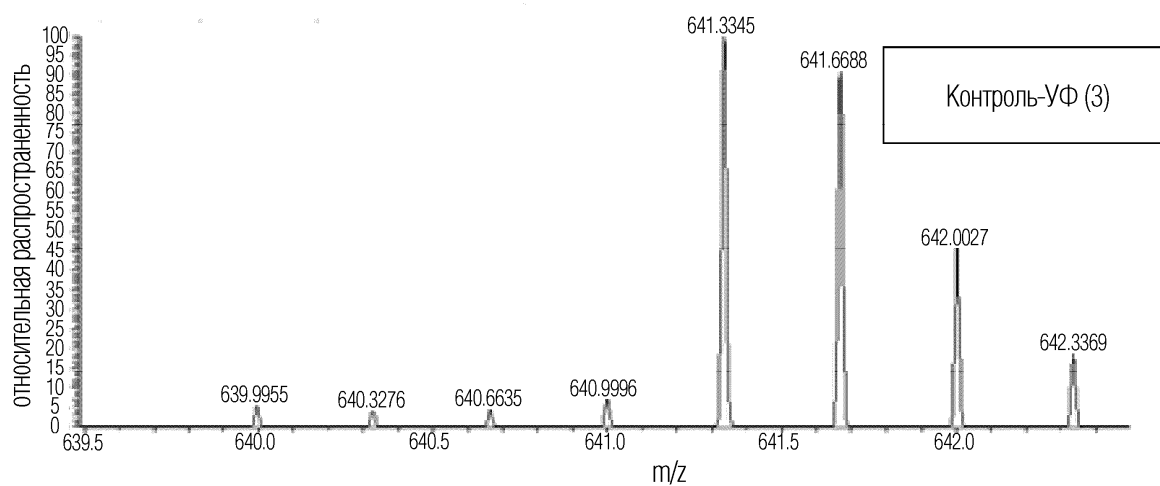
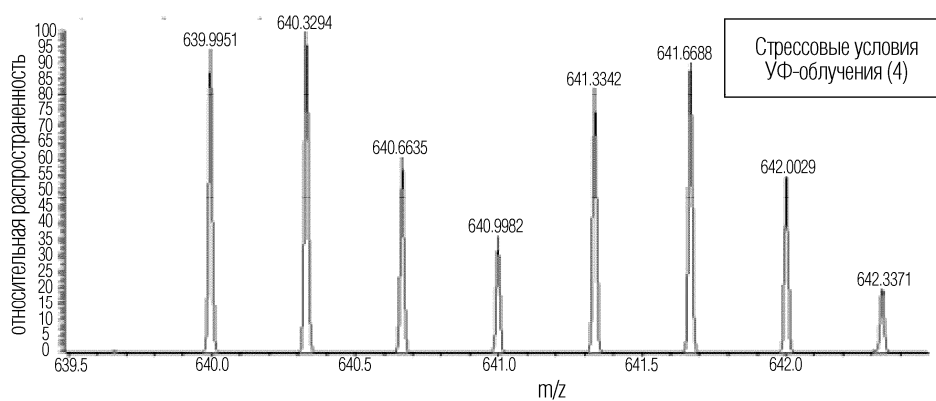


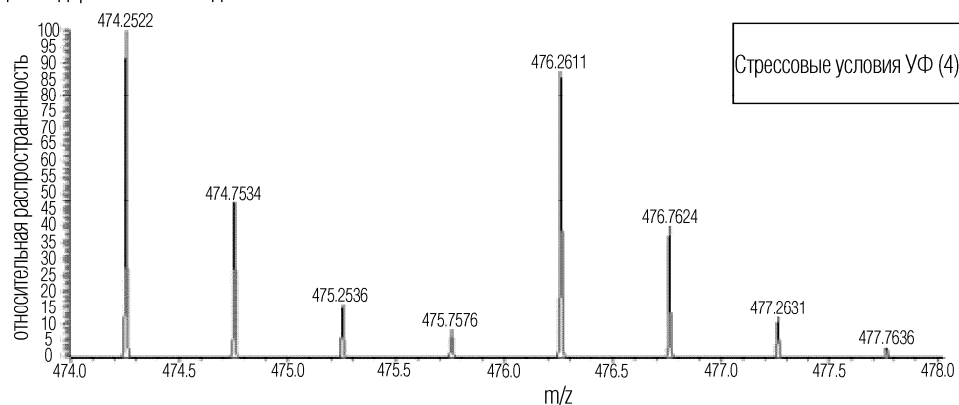
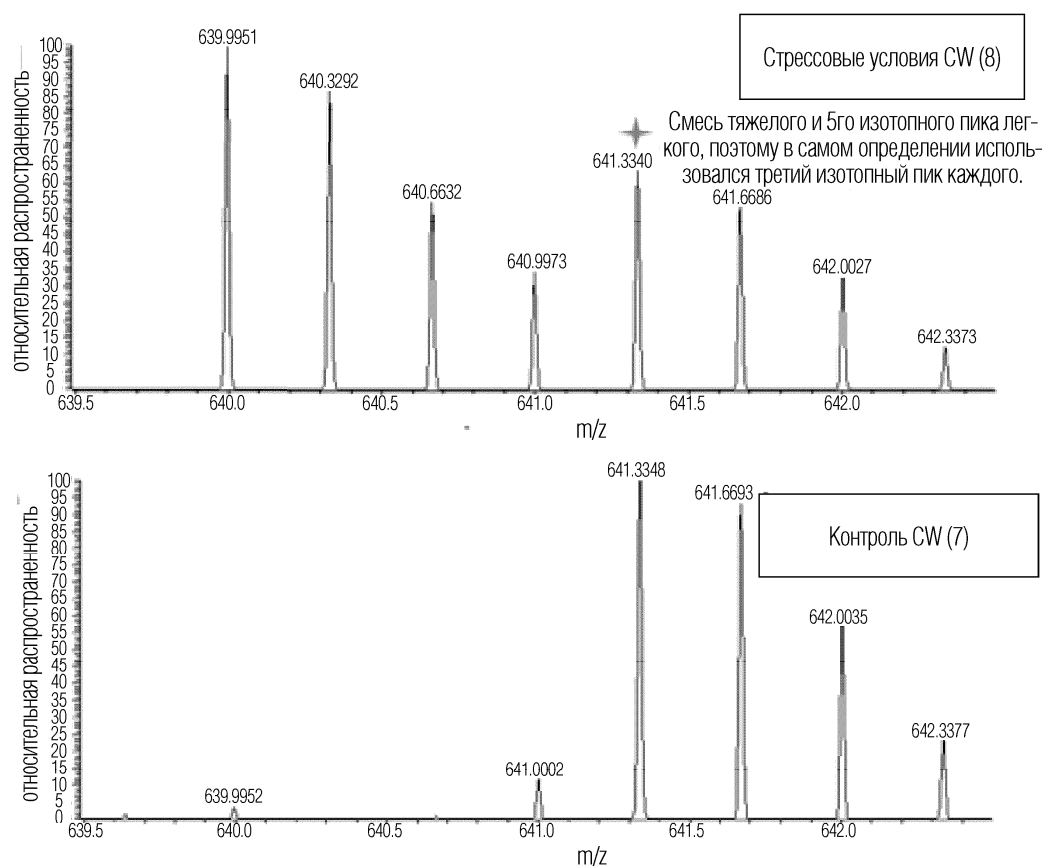
Фиг. 14

Пептид 2

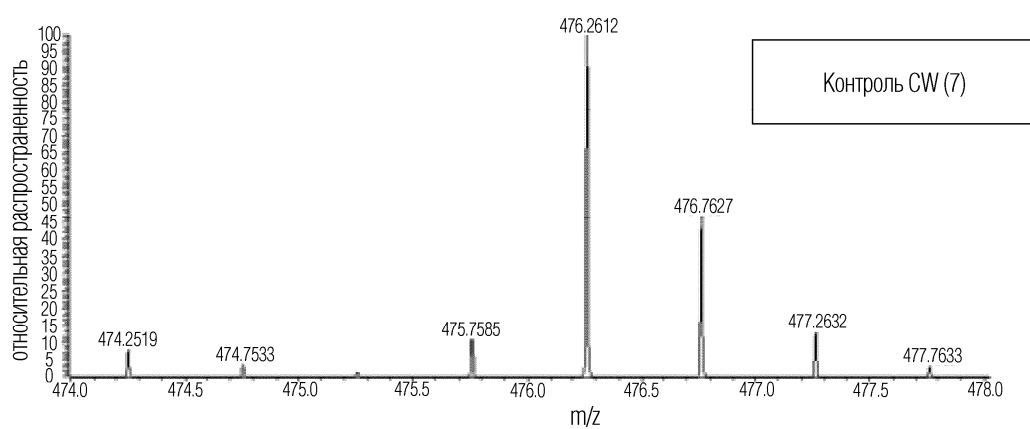
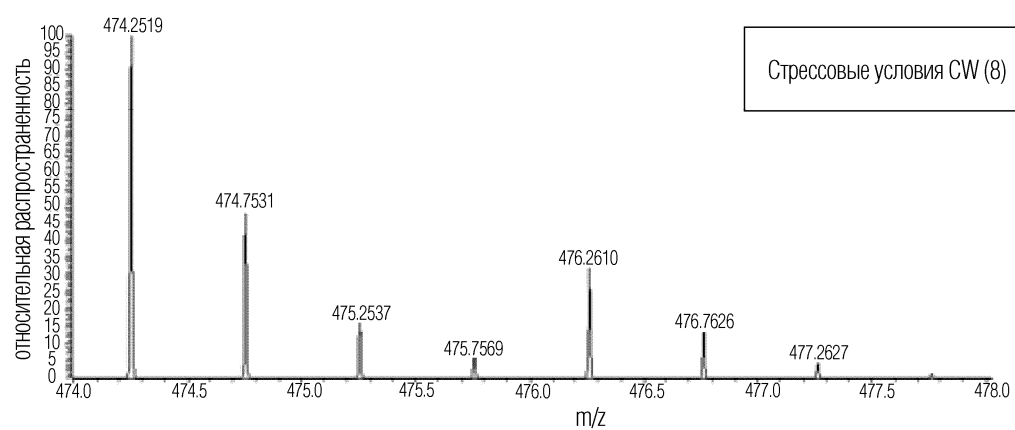
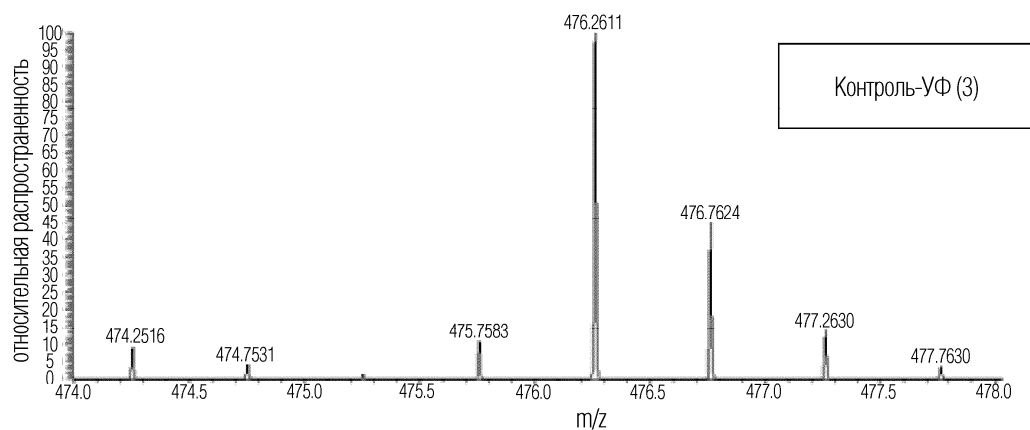
СПОСОБ СО СТРЕССОВЫМИ УСЛОВИЯМИ	UV(%)	CW(%)
СОВМЕСТНО СОСТАВЛЕННЫЙ	11.37	15.73
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ	0.47	0.16

*Данный пептид частично дезамидирован; количественное определение в данном случае осуществляют с использованием нативного пептида





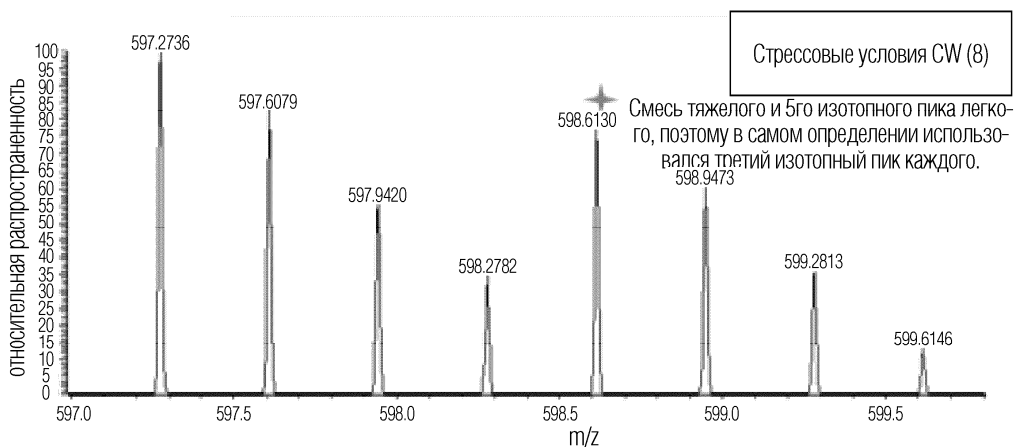
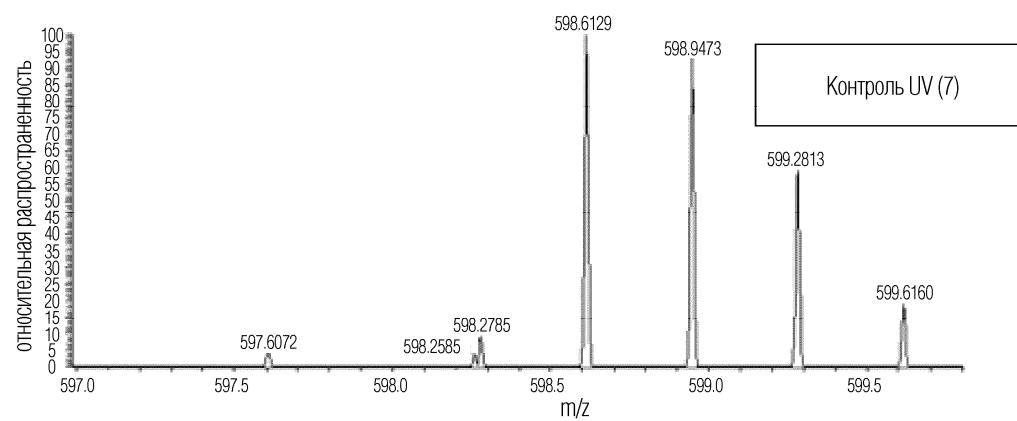
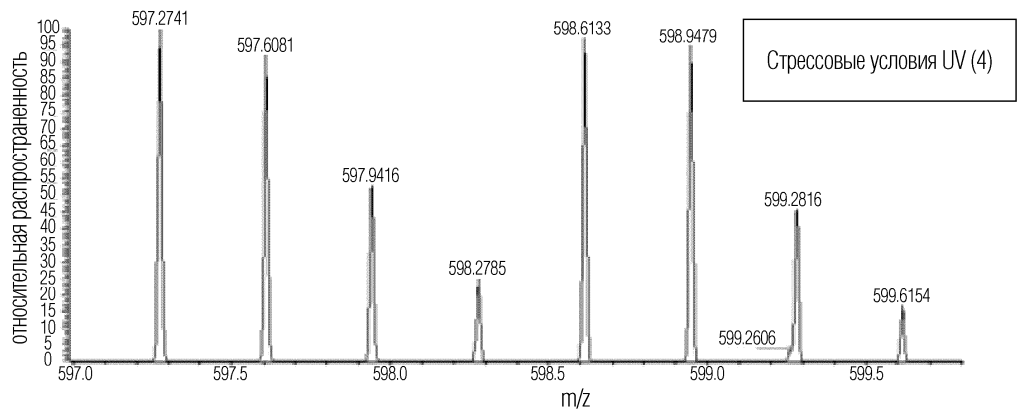
044417



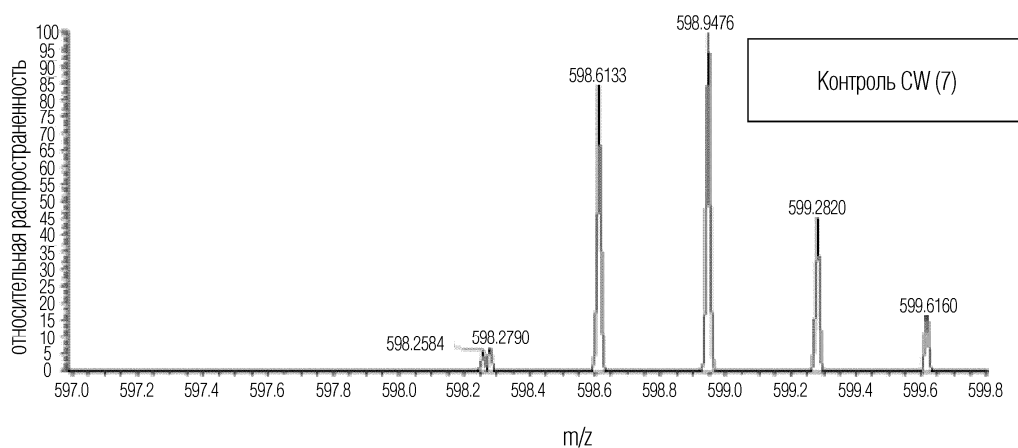
Фиг. 16

Пептид 4

СПОСОБ СО СТРЕССОВЫМИ УСЛОВИЯМИ	UV(%)	CW(%)
СОВМЕСТНО СОСТАВЛЕННЫЙ	11.94	15.36
ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ КОНТРОЛЬ	0.16	0.16



044417



Фиг. 17

Преобразование % слитого белка 1 в % гетеродимера в пиковых областях УФ

Известно:

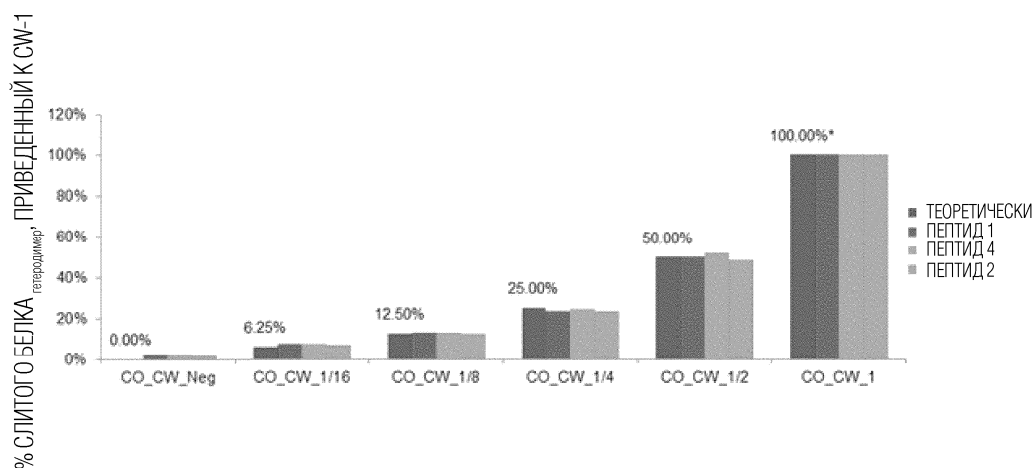
- 40 мг слитого белка 1 и 120 мг mAb1
- Молекулярный вес слитого белка 1 (с гликанами). 117 кДа
- СоЕ слитого белка 1 1,15
- Молекулярный вес mAb1 (с гликанами); 148 кДа
- СоЕ mAb1 1,37
- Молекулярный вес гетеродимера (с гликанами): 117+148=265 кДа
- СоЕ гетеродимера: $(1,15 \times 97,2 + 1,37 \times 145) / (97,2 + 145) = 1,28$ [Без учета гликана]
- Процент слитого белка 1, обнаруженного в гетеродимере, по данным MS: a%

Последующий расчет процента гетеродимера в пиках UW :

$$AU \propto (CoE \times Conc)$$

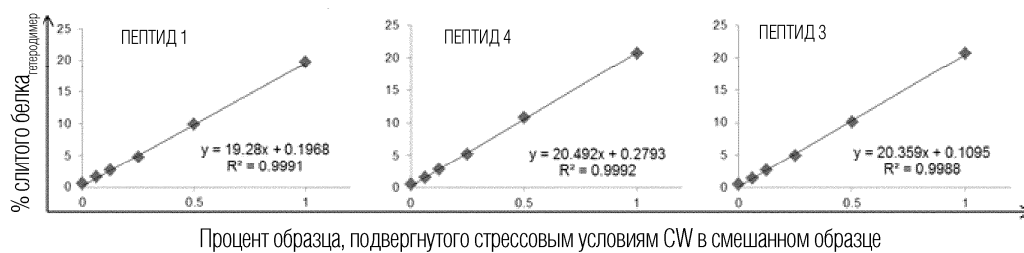
$$\frac{\left(\frac{40 \text{ мг}}{117 \text{ кДа}} \times a\% \times 265 \text{ кДа} \right) \times 1,28}{(40 \text{ мг} \times 1,15 + 120 \text{ мг} \times 1,37)} \approx 0,55a\%$$

Фиг. 18

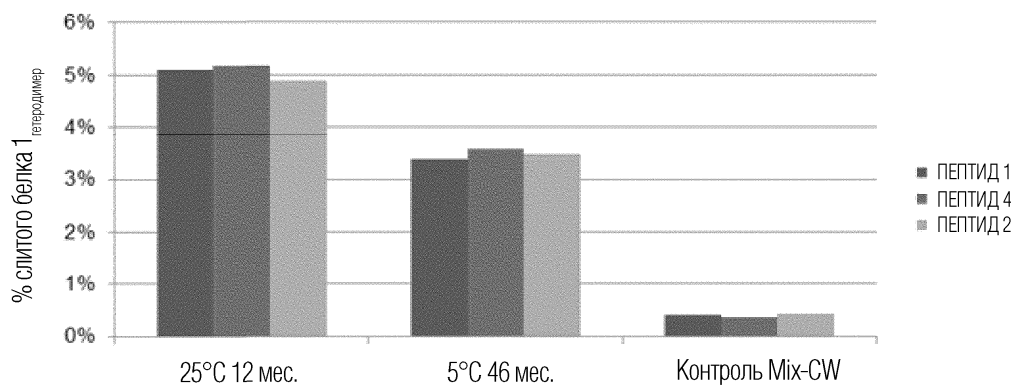


Фиг. 19

Линейность способа проверена с последовательно разбавленным гетеродимером



Фиг. 20



Фиг. 21

