

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045127**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.30

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

(21) Номер заявки
202091578

(22) Дата подачи заявки
2019.02.01

(54) **СИСТЕМА И СПОСОБ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ ДИМЕРИЗАЦИИ БЕЛКОВ**

(31) **62/625,732; 62/738,051**

(32) **2018.02.02; 2018.09.28**

(33) **US**

(43) **2020.10.23**

(86) **PCT/US2019/016278**

(87) **WO 2019/152796 2019.08.08**

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

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

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

(56) ZHANG YING ET AL.: "Mapping the Binding Interface of VEGF and a Monoclonal Antibody Fab-1 Fragment with Fast Photochemical Oxidation of Proteins (FPOP) and Mass Spectrometry", JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, ELSEVIER SCIENCE INC, US, vol. 28, no. 5, 2 March 2017 (2017-03-02), pages 850-858, XP036445645, ISSN: 1044-0305, DOI: 10.1007/S13361-017-1601-7 [retrieved on 2017-03-02], page 851, column 2, paragraph 3 - page 852, column 2, paragraph 3 page 853, column 2, line 1, paragraph 2 - line 7; table 1

GALAHAD DEPERALTA ET AL.: "Structural analysis of a therapeutic monoclonal antibody dimer by hydroxyl radical footprinting", MABS, vol. 5, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 86-101, XP055579732, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.22964, page 98, column 1, paragraph 3 - page 99, column 1, paragraph 1

HAO ZHANG ET AL.: "Carboxyl-Group Footprinting Maps the Dimerization Interface and Phosphorylation-induced Conformational Changes of a Membrane-associated Tyrosine Kinase", MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 10, no. 6, 21 March 2011 (2011-03-21), XP055579765, US ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/mcp.M110.005678, abstract; figure 1 page 5, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1 page 3, left column, para. 3-right column, para. 2

(57) В изобретении предложены системы и способы для характеристики областей димеризации на уровне субдомена белка. Иллюстративный способ включает расщепление образца димера белка на субдомены, мечение образца расщепленного белка, выделение меченых димерных и мономерных фрагментов субдомена и пептидное картирование меченого образца, чтобы определить, где фрагменты димера мечены и где фрагменты димера не мечены. Области, которые демонстрируют меньшие степени мечения в фракции димера, чем в мономерной фракции, вероятно, вовлечены или находятся в непосредственной близости от области димеризации.

B1

045127

045127

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет преимущество и приоритет по предварительной заявке США № 62/625732, поданной 2 февраля 2018 г., и 62/738051, поданной 28 сентября 2018 г., обе из которых включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Область техники изобретения

Данное изобретение в целом направлено на аналитические способы и системы для характеристики сайтов нековалентного взаимодействия в белках и их фрагментах.

Уровень техники

Моноклональные антитела (mAb) успешно использовались для нацеливания на широкий спектр терапевтических участков в течение последних двух десятилетий (Walsh G., Nature biotechnology 2014; 32:992-1000; Lawrence S. Nature biotechnology 2007; 25:380-2). Агрегация белка остается главной проблемой при производстве моноклональных антител и других терапевтических белков. Из-за потенциального влияния на потентность и иммуногенность, важно понимать механизм агрегации, чтобы можно было применять соответствующие стратегии контроля для обеспечения качества продукта.

Картирование области димеризации в молекулах mAb остается сложной задачей из-за сложности и неоднородности димеров mAb. Водород-дейтериевая обменная масс-спектрометрия (HDX MS - hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry), которая была успешной в изучении межбелковых взаимодействий, была мало успешной в выявлении интерфейса димеризации mAb, по-видимому, из-за ограничений метода в обнаружении взаимодействия боковых цепей белка.

Таким образом, целью данного изобретения является создание систем и способов для картирования гетерогенных областей димеризации белков.

Еще одной целью изобретения является получение белковых лекарственных продуктов с пониженными уровнями димеризации.

Еще одной целью изобретения является создание способов получения белковых лекарственных продуктов, имеющих пониженный уровень димеризации.

Краткое описание сущности изобретения

Предлагаются системы и способы для определения областей димеризации белка на уровне пептид/остаток белка. Иллюстративный способ включает расщепление образца димера белка на субдомены, мечение смеси расщепленного образца белка, выделение меченых димерных и мономерных фрагментов субдомена и пептидное картирование меченого образца для определения и сравнения степени мечения в димере и мономере. Области, которые демонстрируют меньшие степени мечения в фракции димера, чем в мономерной фракции, вероятно, вовлечены или находятся в непосредственной близости от области димеризации.

В одном варианте осуществления нековалентные димеры были выделены и проанализированы пептидным картированием для определения местоположения сайтов нековалентного взаимодействия. В другом варианте осуществления для локализации границы раздела нековалентной димеризации на уровне пептида/остатка образец обогащенный димером mAb расщепляли до смеси гомодимера F(ab) [или F(ab')], мономеров F(ab) [или F(ab')] и Fc и подвергали эксперименту по мечению с последующим фракционированием, триптическим расщеплением и ЖХ-МС анализом для количественного определения степени мечения и сравнения на уровнях пептида/остатка. Больше деталей об этапах раскрытых способов представлено ниже.

В еще одном варианте осуществления предложен способ получения антитела, включающий стадии культивирования клеток, продуцирующих антитело в культуре клеток, получение образца из культуры клеток, характеристику областей димеризации в образце антитела согласно описанному выше способу и модификацию одного или большего количества условий культивирования культуры клеток для уменьшения количества димеризации или нековалентного взаимодействия/агрегации антитела, продуцируемого во время культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления образец отбирают во время культивирования клеток с любым интервалом. В других вариантах осуществления образец отбирают после продуцирующего культивирования, после сбора белка или после очистки. Одно или более условий культуры клеток, которые изменяются для уменьшения количества димеризации или агрегации, могут быть выбраны из группы, состоящей из температуры, pH, плотности клеток, концентрации аминокислот, осмоляльности, концентрации факторов роста, перемешивания, парциального давления газа, поверхностно-активных веществ или их комбинации. Клетки могут быть эукариотическими или прокариотическими. Клетками могут быть клетки яичника китайского хомяка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), клетки COS (например, COS-7), клетки сетчатки, клетки Vero, клетки CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), клетки HeLa, клетки HepG2, клетки WI38, клетки MRC 5, клетки Co1o25, клетки FIB 8065, клетки HL-60, клетки лимфоцитов, например, аутологичные Т-клетки, Jurkat (Т-лимфоциты) или Daudi (В-лимфоциты), клетки A431 (эпидермальные), клетки U937, клетки 3T3, L клетки, клетки C127, клетки SP2/0, клетки NS-0, клетки MMT, стволовые клетки, опухолевые клетки и клеточная линия происходящая из любой из вышеупомянутых клеток. В одном варианте осуществления клетки представляют собой клетки гибридомы или квадромы.

В еще одном варианте осуществления предложен способ получения антитела, включающий стадии

культивирования клеток, продуцирующих антитело в культуре клеток, затем очистку и приготовление антитела для получения приготовленного лекарственного вещества (FDS - formulated drug substance), получение образца очищенного антитела до и/или после приготовления антитела, характеризацию области димеризации в указанном образце антитела или образце FDS согласно описанному выше способу, и модификацию одного или большего количества условий очистки или приготовления антитела для уменьшения количества димеризации или нековалентного взаимодействия/агрегации антитела, произведенного в клеточной культуре. Одно или более условий очистки антитела, которые изменяются для уменьшения количества димеризации или агрегации, могут быть выбраны из группы, состоящей из температуры, pH, аффинного матрикса, хроматографической смолы, буферов, фильтров или их комбинаций. Одно или более условий приготовления антитела, которые изменяются для уменьшения количества димеризации или агрегации, могут быть выбраны из группы, состоящей из pH, концентрации антитела, концентрации наполнителя, буферов, поверхностно-активных веществ, стабилизаторов или любых их комбинаций. Один или более наполнителей FDS могут быть изменены для уменьшения количества димеризации или агрегации и выбраны из любого из известных в данной области техники наполнителей.

Еще один вариант осуществления относится к антителу, полученному способами, описанными в данном документе.

Также предложены способы получения модифицированных белковых лекарственных препаратов с пониженной димеризацией или нековалентным взаимодействием относительно немодифицированного белкового лекарственного продукта. В одном варианте осуществления белковый лекарственный продукт представляет собой моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 продемонстрирована схема рабочего процесса иллюстративной стратегии ограниченного расщепления и однократной мечения для отображения интерфейса димеризации mAb.

Фиг. 2 представляет собой график процентного содержания гидрохлорида этилового эфира глицина (GEE - glycine ethyl ester hydrochloride) (мономер-димер) для указанной цепи/остатка, демонстрирующий дифференциальную диаграмму мечения GEE между Fab-димером и Fab-мономером mAb-1, полученным в результате ограниченного расщепления Lys-C BMM обогащенного образца.

Фиг. 3A - гистограмма процента GEE для указанного фрагмента антитела mAb-1 на уровне пептидов. Фиг. 3B представляет собой гистограмму процента GEE для указанного фрагмента антитела mAb-2 на уровне аминокислотных остатков.

Фиг. 4A-4C представляют собой диаграммы рассеяния, демонстрирующие подгонку Пуассона окисленных частиц для ограниченного расщепленного LysC образца mAb1 BMM. Фиг. 4A представляет область Fc, фиг. 4B представляет область LC, а фиг. 4C представляет область Fd. Линия представляет подгонку Пуассона для каждого графика.

Фиг. 5A - гистограмма степени модификации FPOP для указанного фрагмента на уровне пептида mAb-1. Фиг. 5B - гистограмма степени модификации FPOP для указанного фрагмента на уровне остатка mAb-1.

Фиг. 6A и 6B представляют собой диаграммы рассеяния, демонстрирующие подгонку Пуассона окисленных частиц для белка лизоцима с различным положением фокуса и условиями работы лазера.

Фиг. 7A-7F представляют собой диаграммы рассеяния, демонстрирующие подгонку Пуассона окисленных частиц для белка лизоцима с различными концентрациями акцептора (500, 350 или 200 мкМ His) и различными настройками мощности лазера (97 или 156 мДж).

Фиг. 8A-8D представляют собой диаграммы рассеяния, демонстрирующие подгонку Пуассона окисленных частиц для белка лизоцима с различными концентрациями акцептора (500 или 200 мкМ His) и различными концентрациями белка (1 или 0,1 мг/мл).

Фиг. 9A-9B представляют собой диаграммы рассеяния, демонстрирующие подгонку Пуассона окисленных частиц для mAb1 (фиг. 9A) или дегликозилированного mAb1 (фиг. 9B).

Подробное описание сущности изобретения

I. Определения

Использование терминов единственного числа и аналогичных ссылок в контексте описания заявленного в настоящее время изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если иное не указано в данном документе или явно противоречит контексту.

Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для того, чтобы служить кратким способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включается в описание, как если бы оно было отдельно указано в данном документе.

Использование термина "около/приблизительно" предназначено для описания значений выше или ниже заявленного значения в диапазоне прибл. +/-10%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне прибл. +/-5%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне прибл. +/-2%; в других вариантах осуществления значения могут нахо-

даться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне прибл. +/-1%. Предполагается, что предыдущие диапазоны будут понятны из контекста, и никаких дополнительных ограничений не предполагается. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в данном документе или иное явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или примерных формулировок (например, таких как), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни одно выражение в описании не должно быть истолковано как указывающее на любой не заявленный элемент как существенный для практической реализации изобретения.

"Белок" относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, связанных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды и может также включать модификации, такие как гликозилирование, липидное присоединение, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксильное и ADP-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая препараты на основе белков, и белки включают, помимо прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных методов культивирования клеток и, как правило, вводятся в клетку путем трансфекции генно-инженерных нуклеотидных векторов (например, таких как последовательность, кодирующая химерный белок, или кодон-оптимизированная последовательность, последовательность без интронов и т.д.), где векторы могут находиться в виде эписомы или быть интегрированы в геном клетки.

"Антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит домен CH1, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть далее подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Каждая цепь VH/CH1 и VL/CL ассоциируется (например, с помощью дисульфидных мостиков) с образованием пары или F(ab), имеющих антигенсвязывающий сайт на своем N-конце. Таким образом, после ограниченного расщепления ферментом фрагмент F(ab) [или F(ab')] представляет собой фрагмент антитела, который все еще связывается с антигенами, но является одновалентным без части Fc. Антитело обычно является двухвалентным в отношении антигенсвязывания и, как таковое, включает две части F(ab), обозначаемые как F(ab')₂, связанные вместе дисульфидными мостиками в верхнем шарнире. F(ab')₂-фрагменты генерируются путем ограниченного расщепления целых антител для удаления большей части Fc-области, при этом оставляя нетронутыми некоторые шарнирные области, и могут быть дополнительно уменьшены до F(ab')-фрагментов. Термин "антитело" включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает молекулы антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такими как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним различным эпитопом. Структуры двухвалентных антител также могут быть биспецифичными в отношении специфичности каждого антигенсвязывающего сайта к различным антигенам. Биспецифичные антитела в целом описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527, которая включена в данную заявку посредством ссылки.

"Fc-слитые белки" включают часть или все два или более белков, один из которых представляет собой Fc-часть молекулы иммуноглобулина, которые иначе не встречаются вместе в природе. Получение слитых белков, содержащих определенные гетерологичные полипептиды, слитые с различными частями полипептидов, полученных из антител (включая домен Fc), было описано, например, Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 10535, 1991; Бирн и др., Nature 344: 677, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11, 1992. "Рецепторные Fc-слитые белки" включают один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирный участок, за которым следуют CH2- и CH3-домены иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок содержит две или более различных рецепторных цепей, которые связываются с одним или более лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой ловушку, такую как, например, ловушка IL-1 или ловушка VEGF.

"Клеточная культура" относится к размножению или пролиферации клеток в сосуде, таком как колба или биореактор, и включает, но не ограничивается ими, культуру с подпиткой, непрерывную культуру, перфузионную культуру и тому подобное.

Термин "МС/МС" относится к методике масс-спектрометрии, в которой используются два масс-спектрометра в тандеме. Между двумя анализаторами (МС1 и МС2) находится газовая ячейка столкновения. Ионы-предшественники, отобранные МС1, сталкиваются с газом высокого давления (обычно Не) в ячейке и подвергаются фрагментации.

Термин "ЖХ-МС" относится к жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии, которая представляет собой метод аналитической химии, который сочетает физические возможности разделения жидкостной хроматографии (или ВЭЖХ) с возможностями масс-анализа масс-спектрометрии (МС).

Термин "консервативная аминокислотная замена" относится к замене аминокислоты другой, которая обладает сходными свойствами. Ожидается, что этот тип замены редко приводит к дисфункции соответствующего белка.

II. Белковые лекарственные препараты

Один вариант осуществления обеспечивает белковый лекарственный продукт, который был модифицирован для уменьшения димеризации белкового лекарственного продукта или нековалентного взаимодействия. Модификация может представлять собой консервативную аминокислотную замену. При консервативной аминокислотной замене аминокислота заменяется другой, которая обладает сходными свойствами. Ожидается, что этот тип замены редко приводит к дисфункции соответствующего белка.

A. Белки представляющие интерес

В одном варианте осуществления белковый лекарственный продукт может содержать один или более представляющих интерес белков, подходящих для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках. Например, представляющий интерес белок включает, но не ограничивается этим, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, ScFv или его фрагмент, Fc-слитый белок или его фрагмент, фактор роста или его фрагмент, цитокин или его фрагмент или внеклеточный домен рецептора клеточной поверхности или его фрагмент. Представляющие интерес белки могут представлять собой простые полипептиды, состоящие из одной субъединицы, или сложные мультисубъединичные белки, содержащие две или более субъединиц. Представляющий интерес белок может представлять собой биофармацевтический продукт, пищевую добавку или консервант или любой белковый продукт, подлежащий очистке и стандартам качества.

В некоторых вариантах осуществления белковый продукт (представляющий интерес белок) представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антигенсвязывающего антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, двуспецифическую четырехвалентную иммуноглобулин G-подобную молекулу, называемую иммуноглобулином с двойным переменным доменом (DVD-IG - dual variable domain immunoglobulin), антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1 антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В другом варианте осуществления антитело содержит химерный шарнир. В еще других вариантах осуществления антитело содержит химерный Fc. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из анти-белок запрограммированной клеточной гибели 1 антитела (например, анти-PD1-антитела, как описано в патенте США US-A-2015/0203579A1), анти-лиганд белка запрограммированной клеточной гибели-1 (например, антитела против PD-L1, как описано в патенте США US-A-2015/0203580A1), антитела против D114, антитела против ангиопоэтина-2 (например, анти-ANG2 антитела, как описано в патенте США № 9402898), антитела против ангиопоэтина 3 (например, антитела против AngPt13, как описано в патенте США № 9018356), антитела к рецептору фактора роста, полученного против тромбоцитов (например, антитела против PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела против Erb3, антитела против рецептора пролактина (например, антитела против PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела против комплемента 5 (например, анти-C5-антитела, как описано в патенте США № US2015/0313194A1), анти-TNF-антитела, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, анти-EGFR антитела, как описано в патенте США № 9132192 или анти-EGFRvIII антитела, как описано в патентной заявке США № US2015/0259423 A1), антипропротеин-конвертаза субтилизин-кексин-9-антитела (например, анти-PCSK9-антитела, как описано в патенте США № 8062640 или в патентной заявке США US2014/0044730A1), антитела против фактора роста и дифференцировки-8 (например, антитела против GDF8, также известного как антитело против миостатина, как описано в патентах США № 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагона (например, антитела против GCGR, как описано в патентной заявке США № US 2015/0337045A1 или US 2016/0075778A1), антитела против VEGF, антитела против IL1R, антитела к рецептору интерлейкина 4 (например, антитела против IL4R, как описано в публикации патентной заявки США № US2014/0271681A1 или патентах США № 8735095 или 8945559), антитела против рецептора интерлейкина-6 (например, антитела против IL6R, как описано в

патентах США №№ 7582998, 8043617 или 9173880), анти-IL1 антитела, анти-IL2-антитела, анти-IL3-антитела, анти-IL4-антитела, анти-IL5-антитела, анти-IL6-антитела, анти-IL7-антитела, анти-интерлейкин 33 (например, анти-IL33-антитела, как описано в публикации патентной заявки США №№ US 2014/0271658A1 или US 2014/0271642A1), антиреспираторный синцитиальный вирус антитела (например, анти-RSV-антитела, как описано в публикации патента США № US 2014/0271653A1), анти-кластер дифференцировки 3 (например, анти-CD3-антитела, как описано в патентной заявке США №№ US 2014/0088295A1 и US 20150266966A1 и в заявке США № 62/222605), антикластер дифференцировки 20 (например, анти-CD20-антитела как описано в патентной заявке США №№ US 2014/0088295A1 и US 20150266966A1 и в патенте США № 7879984), анти-CD19-антитела, анти-CD28-антитела, анти-кластер дифференцировки-48 (например, антитела против CD48, как описано в патенте США № 9228014), антитела против Fel d1 (например, как описано в патенте США № 9079948), антивирус ближневосточного респираторного синдрома (например, анти-MERS антитела, как описано в публикации патента США № US 2015/0337029A1), антитела против вируса Эбола (например, как описано в публикации патента США № US 2016/0215040), антитела против вируса Зика, антитела против гена 3 активации лимфоцитов (например, антитела против LAG3 или антитела против CD223), антитела против фактора роста нервов (например, антитела против NGF, как описано в публикации патентной заявки США №№ US 2016/0017029 и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела против активина А. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела против CD3 x против CD20 (как описано в патентной заявке США №№ US 2014/0088295A1 и US 20150266966A1), биспецифического антитела против CD3 x против муцина 16 (например, биспецифического антитела против CD3 x против Muc16) и биспецифического антитела против CD3 x против простат-специфического мембранного антигена (например, биспецифического антитела против CD3 x против-PSMA). В некоторых вариантах осуществления, представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаба, адалимумаба-атто, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белимумаб, бенрализумаба, бевацизумаба, безлотоксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, каракинумаба, капромаба пендетида, цертолизумаба, цемипилимаба, цетуксимаба, деносумаба, динутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-kxwh (emicizumab-kxwh), эмансинилирокумаба, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гуселкумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-абда, инфликсимаба-дииб (infliximab-dyub), ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нектимумаба, несвакумаба, ниволумаба, обилтоксасимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуцирумаба, раниби-зумаба, раксибакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревогрумаба, устекинумаба и ведолизумаба.

В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит фрагмент Fc и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой рецепторный Fc-слитый белок, который содержит один или более внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления рецептор Fc-слитого белка содержит две или более различных рецепторных цепей, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок-ловушку, такой как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит область связывания лиганда IL-1RAcP, слитую с внеклеточной областью IL-1R1, слитую с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004, который полностью включен в данное описание в качестве ссылки), или ловушку VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, которая содержит Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептор VEGF Flk1, слитый с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или более из одного или большего количества антигенсвязывающих доменов, таких как вариабельный фрагмент тяжелой цепи и вариабельный фрагмент легкой цепи, антитело, связанное с фрагментом Fc.

В. Способы получения белков

В одном варианте осуществления белковый лекарственный продукт получают в культуре клеток с подпиткой. При производстве белка "периодическая культура клеток с подпиткой" или "периодическая культура с подпиткой" относится к периодической культуре, в которой клетки и культуральную среду первоначально подают в сосуд для культивирования, а дополнительные питательные вещества для культуры медленно, с дискретными приращениями, подают в культуру во время культивирования, с или без периодического сбора клеток и/или продуктов до прекращения культивирования. Периодическая культура с подпиткой включает "полу непрерывную периодическую культуру с подпиткой", в которой периодически целую культуру (которая может включать клетки и среду) удаляют и заменяют свежей средой. Периодическая культура с подпиткой отличается от простой "периодической культуры", в то время как все компоненты для культивирования клеток (включая клетки животных и все питательные вещества культуры) подают в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования в периодической

культуре. Периодическая культура с подпиткой может отличаться от "перфузионной культуры", поскольку супернатант не удаляется из сосуда для культивирования во время стандартного периодического процесса с подпиткой, тогда как при перфузионном культивировании клетки удерживаются в культуре, например, путем фильтрации и культуральная среда непрерывно или периодически вводится и удаляется из культурального сосуда. Однако предполагается отбор образцов для целей тестирования во время культуры клеток с подпиткой. Процесс с подпиткой продолжается до тех пор, пока не будет определено, что максимальный рабочий объем и/или выработка белка не достигнуты, а затем белок не собран.

Один вариант осуществления обеспечивает белковый лекарственный продукт, который производится в непрерывной клеточной культуре. Фраза "непрерывная клеточная культура" относится к методике, используемой для непрерывного роста клеток, обычно в определенной фазе роста. Например, если требуется постоянная поставка клеток или требуется производство конкретного представляющего интерес белка, клеточная культура может требовать поддержания в определенной фазе роста. Таким образом, условия должны постоянно контролироваться и корректироваться соответствующим образом, чтобы поддерживать клетки в этой конкретной фазе.

Культуры клеток, используемые для получения белкового лекарственного продукта, включают среду для культивирования клеток. Термины среда для культивирования клеток и среда для культивирования относятся к питательному раствору, используемому для выращивания клеток млекопитающих, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как необходимый углеводный источник энергии, существенные (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и несущественные (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин) аминокислоты, микроэлементы, источники энергии, липиды, витамины, и т.п. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые поставляют сырье, которое поддерживает рост клеток. Среда может содержать экстракты дрожжей или сои вместо экстрактов животного происхождения. Химически определенная среда относится к среде для культивирования клеток, в которой все химические компоненты известны (т.е. имеют известную химическую структуру). Химически определенная среда полностью не содержит компонентов животного происхождения, таких как пептоны сывороточного или животного происхождения. В одном варианте осуществления среда представляет собой химически определенную среду.

Раствор также может содержать компоненты, которые увеличивают рост и/или выживаемость выше минимальной нормы, включая гормоны и факторы роста. Раствор может быть составлен до pH и концентрации соли, оптимальных для выживания и пролиферации конкретной культивируемой клетки.

"Клеточная линия" относится к клетке или клеткам, которые получены из определенной линии через последовательный пассаж или субкультивирование клеток. Термин "клетки" используется взаимозаменяемо с "клеточной популяцией".

Термин "клетка" включает любую клетку, которая подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот, такие как бактериальные клетки, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки животных, не являющиеся человеком, клетки птиц, клетки насекомых, клетки дрожжей или клеточные слияния, такие как, например, гибридомы или квадромы. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления клетка выбрана из следующих клеток: яичника китайского хомяка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, W138, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцита, например Jurkat (Т-лимфоцита) или Daudi (В-лимфоцита), клетки A431 (эпидермальной), U937, 3T3, L-клетки, C127 клетки, SP2/0, NS-0, клетки ММТ, стволовой клетки, опухолевой клетки и клеточной линии, полученной из вышеупомянутых клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов, например, клетку сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетку PER.C6®). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO K1.

Способы очистки белков хорошо известны в данной области. Лекарственный продукт может подвергаться ряду стадий очистки после культивирования клеток и сбора белка для удаления примесей, включая белки клеток-хозяев и aberrантные формы лекарственного продукта, связанные с процессом культивирования клеток. Формы хроматографии хорошо известны, такие как "аффинная хроматография", которая представляет собой хроматографический метод, который использует специфические, обратимые взаимодействия между белками, а не общие свойства белка, такие как изоэлектрическая точка, гидрофобность или размер, для осуществления хроматографического разделения. "Аффинная хроматография с белком А" или "Хроматография с белком А" относится к методу специфической аффинной хроматографии, который использует сродство IgG-связывающих доменов белка А к Fc-части молекулы иммуноглобулина. Эта часть Fc содержит константные домены иммуноглобулина человека или животного CH2 и CH3 или домены иммуноглобулина, по существу аналогичные этим. Другие формы хроматографии или методы разделения включают, но не ограничиваются: Аффинная хроматография с белком G,

His-Tagged аффинная хроматография, ионообменная (слабый катион, слабый анион, сильный катион, сильный анион) хроматография, эксклюзионная хроматография, хроматография с обращенной фазой, нормальная фазовая хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием, хроматография с гидрофильным взаимодействием. Каждый метод требует оптимизации подходящих условий, включая, помимо прочего, загрузку и размер смолы, условия отмывки, pH, объем загрузки, концентрацию загрузки и тому подобное. Способы ультрафильтрации и диафильтрации также предусматриваются в процессе очистки.

Способы составления белков хорошо известны в данной области. Лекарственные продукты по данному изобретению включают жидкие фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы (например, антитело) по данному изобретению. Фармацевтические композиции по данному изобретению составлены с подходящими носителями, наполнителями и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в рецептуре, известной всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Например, наполнители могут включать стабилизатор, буфер, тонизирующее средство, поверхностно-активное вещество, органический растворитель, соль или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления стабилизатор выбран из группы, состоящей из полиола, сахара, аминокислоты, неионного поверхностно-активного вещества и их комбинации. В некоторых вариантах тонизатор выбирают из группы, состоящей из сахара, аминокислоты, соли и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления лекарственный продукт представляет собой жидкую композицию или восстановленную лиофилизированную композицию лекарственного продукта. В некоторых вариантах осуществления лекарственный продукт представляет собой совместную композицию, которая содержит два или более различных антител.

III. Способы определения области димеризации в белках

Агрегация белка остается главной проблемой при производстве моноклональных антител. Из-за потенциального влияния на чистоту, активность и иммуногенность, важно понимать механизм агрегации, чтобы можно было применять соответствующие стратегии контроля для обеспечения качества продукта. Картирование области димеризации в молекуле mAb остается сложной задачей из-за сложности и неоднородности димеров mAb. Хотя водородно-дейтериевая обменная масс-спектрометрия (HDX MS) была успешной в изучении межбелковых взаимодействий, она была мало полезной в выявлении области димеризации mAb, по-видимому, из-за ограничений метода в обнаружении взаимодействия боковых цепей белка.

Для преодоления этих препятствий предлагаются новые системы и методы для успешного картирования гетерогенных областей димеризации (как ковалентных, так и нековалентных) белка с помощью комплексных методов на основе MS. Иллюстративная стратегия для отображения интерфейса димеризации представлена на фиг. 1. Белок может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, рекомбинантный белок или слитый белок.

A. Способы характеристики сайтов нековалентного взаимодействия

Один вариант осуществления обеспечивает способ определения областей димеризации на уровне пептида/остатка белка. Иллюстративный способ включает расщепление образца димера белка на субдомены, мечение смеси расщепленного образца белка, выделение меченых димерных и мономерных фрагментов субдомена и пептидное картирование меченого образца для определения и сравнения степени мечения в димере и мономере. Области, которые демонстрируют меньшие степени мечения в фракции димера, чем в мономерной фракции, вероятно, вовлечены или находятся в непосредственной близости от области димеризации.

В одном варианте осуществления пептиды выделяли и анализировали путем картирования пептидов для определения местоположения сайтов нековалентного взаимодействия. В другом варианте осуществления для локализации границы раздела нековалентной димеризации на уровне пептида/остатка образец обогащенный димером mAb расщепляли до смеси F(ab) [или F(ab')] -гомодимера, F(ab) [или F(ab')] и Fc-мономеров, затем подвергают эксперименту по ковалентному мечению с последующим SEC-фракционированием, триптическим расщеплением и ЖХ-МС анализом для количественного определения степени мечения и сравнения на уровнях пептида/остатка. В еще одном варианте осуществления для локализации границы раздела нековалентной димеризации на уровне пептид/остаток образец обогащенный димером mAb расщепляли до смеси F(ab) [или F(ab')] -гомодимера, F(ab) [или F(ab)] и Fc-мономеров, затем подвергали одному эксперименту по мечению FPOP (fast photochemical oxidation of proteins - быстрое фотохимическое окисление белков) с последующим SEC-фракционированием, триптическим расщеплением и ЖХ-МС анализом для количественного определения степени мечения и сравнения на уровнях пептида/остатка. Больше подробностей об этапах раскрытых способов предоставлено ниже.

1. Фрагментация белковых димеров

В одном варианте осуществления белковый лекарственный продукт, например антитело, получают из клеточной культуры и обогащают димерами для получения обогащенного образца димера. Обогащенный образец димера может быть получен с использованием различных технологий обогащения, включая, но не ограничиваясь, жидкостной хроматографией. Предпочтительный метод жидкостной хроматогра-

фии включает, но не ограничивается ими, эксклюзионную хроматографию по размеру. В некоторых вариантах осуществления образец обогащенный димером содержит некоторые белковые агрегаты, отличные от димеров. Таким образом, образец обогащенный димером не обязательно должен состоять только из димеров. В одном варианте осуществления образец обогащенный димером содержит более 50% димеров.

Фрагментация или расщепление белкового продукта, например, для сохранения нековалентных взаимодействий, образующих димер mAb, может быть осуществлена с использованием обычных методов, часто называемых ограниченным расщеплением, включая химические и ферментативные методики. В одном варианте осуществления образец димера mAb расщепляют в нативных условиях для получения различных фрагментов Fab и Fc, например, смеси гомодимера F(ab), мономеров F(ab) и Fc, с использованием протеазы. Типичной протеазой является эндопротеаза LysC. Другие протеазы включают папаин и фикаин. В одном варианте осуществления димер mAb может быть разбавлен в 10 мМ Трис-НСl (рН 7,5) и затем инкубирован с эндопротеазой Lys-C (белок: фермент=400:1). Эта обработка с ограниченным расщеплением, в частности, расщепляет тяжелую цепь с остатком Lys, который является N-концом двух дисульфидных связей шарнирной области, что приводит к образованию фрагментов Fab и Fc. Любые нековалентные димерные взаимодействия (чаще всего F(ab) - F(ab)) от димерных частиц сохраняются в смеси.

В другом варианте осуществления образец димера mAb расщепляют на фрагменты F(ab')₂ и Fc* (т.е. два полипептида Fc, которые взаимодействуют посредством нековалентных взаимодействий, называемых в данном документе как мономеры Fc) в нативных условиях с протеазой IdeS, продаваемой под названием FabRICATOR®. Димер mAb можно сначала развести в 10 мМ Трис-НСl (рН 8,0), а затем расщепить с помощью FabRICATOR® (1 IUB миллиединица на 1 мкг белка). Эта ограниченная обработка расщеплением, в частности, расщепляет между двумя остатками Gly, сайтом, который является C-концом двух дисульфидных связей шарнирной области. Эта обработка может привести к образованию одного фрагмента F(ab')₂ и двух идентичных фрагментов Fc/2, которые связаны друг с другом посредством нековалентных взаимодействий (Fc*). Затем смесь расщепления можно инкубировать с восстановителем, который восстанавливает межцепочечные дисульфидные связи, сохраняя при этом внутрицепные дисульфидные связи нетронутыми. В результате фрагменты F(ab')₂ восстанавливаются на два фрагмента F(ab'), и Fd и LC связываются вместе посредством нековалентного взаимодействия. Нековалентные димерные взаимодействия (чаще всего F(ab')-F(ab')) из видов димеров также поддерживаются в смеси.

Типичные восстановители, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, дитиотреитол (DTT, CAS 3483-12-3), бета-меркаптоэтанол (BME, 2BME, 2-ME, b-mer, CAS 60-24-2), 2-аминоэтантол (2-MEA-HCl, также называемый цистеамин-НСl, CAS 156-57-0), ТРИС (2-карбокситил) фосфин гидрохлорид, (TCPEP, CAS 5961-85-3), гидрохлорид цистеина (Cys-HCl, CAS 52-89-1) или натриевая соль 2-меркаптоэтансульфоновой кислоты (MESNA - 2-mercaptoethanesulfonic acid sodium salt). В данной области техники известны другие способы восстановления белковых связей, такие как иммобилизованная восстановительная колонка, которая содержит смолу, в которую был иммобилизован восстановитель на основе тиола для обеспечения твердофазного восстановления пептидных и белковых дисульфидных связей. Восстанавливающие агенты, включая окисляющие агенты, которые подходят для уменьшения химического взаимодействия между полипептидами, также предусмотрены.

2. Мечение фрагментов белка

i) Мечение карбоксильной группы

В одном варианте осуществления расщепленный образец mAb метят с использованием метки карбоксильной группы. Отпечатки карбоксильных групп - это широко используемый метод ковалентного мечения для изучения конформации и взаимодействия белков путем мечения боковых цепей остатков Asp и Glu гидрохлоридом этилового эфира глицина (GEE). В реакции мечения GEE карбоксильные группы из остатков Asp и Glu, расположенные на поверхности белка, легко модифицируются, тогда как те, которые погребены во внутренней структуре белка, претерпевают меньше или даже не модифицируются. В одном варианте осуществления расщепленный образец может быть смешан с 0,2 М 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид гидрохлоридом (EDC-1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride) и 2 М GEE и инкубирован при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакцию мечения GEE можно погасить добавлением 1М трис-НСl (рН 8). В одном варианте осуществления раствор образца затем может быть сконцентрирован. Способы концентрирования образцов хорошо известны в данной области. Типичные способы включают, но не ограничиваются ими, мембранный диализ, осаждение или высаливание, целлюлозные мембранные концентраторы и центрифугирование. В предпочтительном варианте осуществления образец концентрируют центрифугированием, используя, например, центробежный фильтр Ultracel-10K.

ii) Быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP)

В одном варианте осуществления расщепленный образец mAb метят с использованием FPOP. FPOP - это хорошо разработанный метод мечения гидроксильных радикалов, который метит белок в боковой цепи аминокислотного остатка в микросекундном масштабе времени, и широко применяется для изучения

взаимодействий белок-белок/лиганд. В одном варианте осуществления в растворе расщепленного димера mAb, содержащего фрагменты mAb и димеры нековалентно связанных фрагментов, заменяют буфер на соответствующий буфер, например, PBS (pH 7,4). Замена буфера может быть необходима, потому что гасители быстро реагируют с радикалами OH, и их следует избегать во время мечения. Обычные гасители включают, но не ограничиваются ими, некоторые буферные растворы, такие как трис-HCl, и химические вещества, такие как глицерин и DTT.

Мечение ·OH может вызвать конформационные изменения нативной конформации белка. В одном варианте осуществления поглотители могут быть использованы для контроля времени жизни радикала OH, чтобы белок не был чрезмерно мечен, что обеспечивает сохранение нативной конформации, а не чрезмерно меченный белок с конформационными изменениями. Иллюстративные поглотители, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, Cys, Trp, Tyr, Met, His, Phe, Arg, Ile, Leu, Val, Pro, Gln, Thr и Lys. В предпочтительном варианте поглотитель является His. Смесь с замененным буфером может быть сначала смешана с PBS и концентрированным раствором поглотителя и стоковым раствором H₂O₂. Его можно добавлять в концентрации 200-500 мкМ. Его концентрация может быть 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475 или 500 мкМ. Иллюстративная смесь содержит 1 мг/мл расщепляющей смеси mAb, 350 мкМ His и 20 мМ H₂O₂ для получения окончательных 100 мкл раствора. В одном варианте осуществления изобретения H₂O₂ можно добавлять непосредственно перед закачкой раствора в трубки для FPOP.

Окислительное мечение белка можно отслеживать путем моделирования интенсивности немодифицированных видов +16 Да, +32 Да и +48 Да по распределению Пуассона. Значения распределения состояния при добавлении кислорода могут быть проверены на соответствие пригодности распределению Пуассона. В одном варианте осуществления данные, которые не вписываются в предсказанное распределение Пуассона, указывают на чрезмерную мечение белка. В качестве альтернативы, если данные вписываются в модель Пуассона, существует достаточная маркировка без чрезмерной мечения белка.

В одном варианте осуществления образец может быть загружен в газонепроницаемый шприц объемом 100 мкл и введен через шприцевой насос, соединенный с трубкой из плавленого кварца с внутренним диаметром 150 мкм. Трубка может иметь прозрачное окно в центре, обращенное к лазерному лучу. Лазер может представлять собой эксимерный лазер, например эксимерный лазер KrF. Можно использовать любые коммерчески доступные эксимерные лазеры, например, лазер COMPEX 50 (Coherent Inc.). Мощность эксимерного лазера на KrF может составлять от 100 до 150 мДж/импульс. В предпочтительном варианте осуществления мощность лазера может составлять примерно от 100 до 120 мДж/импульс. Частота импульсов лазера может быть установлена на 6 Гц. Ширина лазерного луча в окне прозрачной пробирки может составлять примерно от 1,5 до 3,0 мм. Ширина лазера может составлять 1,5 мм, 1,75 мм, 2 мм, 2,25 мм, 2,5 мм, 2,75 мм или 3 мм. Мощность лазера со временем может колебаться. Следовательно, в одном варианте осуществления один и тот же набор экспериментов по маркировке может быть выполнен в один и тот же день для максимальной последовательности мечения. В другом варианте осуществления дозиметры могут быть добавлены для мониторинга колебаний эффективности мечения между циклами.

После включения импульсного лазера раствор образца может быть введен в трубку, например, при скорости потока 23,86 мкл/мин. Скорость потока можно регулировать в соответствии с внутренним диаметром трубки, частотой лазера и измеренной шириной лазерного луча. Скорость потока должна быть достаточной для обеспечения 20% объема исключения, чтобы избежать повторного воздействия ·OH и реакции. В одном варианте осуществления капиллярный отток может быть собран во флакон, содержащий растворы, для уменьшения остаточного H₂O₂. Уменьшение остаточного H₂O₂ может быть достигнуто с использованием восстановителей, антиоксидантов или их комбинации. Типичные неферментативные антиоксидантные агенты включают, но не ограничиваются ими, витамин А, витамин С, витамин Е, бета-каротин, каротин, таурин, гипотаурин, глутатион, селен, цинк, метионин и убихинон. Ферментативные антиоксидантные агенты включают, но не ограничиваются ими, SOD, каталазу, глутаредоксин и глутатионредуктазу. В предпочтительном варианте осуществления раствор для уменьшения остаточного H₂O₂ содержит метионин и каталазу. Меченый раствор для оттока пробы может быть сконцентрирован центрифугированием, например, с использованием центробежного фильтра Ultracel-10K.

iii) Выделение димеров и мономеров меченых фрагментов mAb В одном варианте осуществления смесь образцов с ковалентной меткой может быть разделена с помощью эксклюзионной хроматографии по размеру, например колонки VEN® SEC. После разделения SEC и УФ-детекции (280 нм) димерный и мономерный фрагменты можно собирать для анализа картирования триптического пептида.

Понятно, что раскрытые способы не ограничены какой-либо конкретной последовательностью этапов фракционирования (ограниченного расщепления) и мечения, как представлено в данном документе.

iv) Пептидное картирование меченых димерных фрагментов В одном варианте осуществления димерные и мономерные фракции могут быть подвергнуты триптическому пептидному картированию. Способы триптического пептидного картирования известны в данной области. В одном варианте осуществления фракции димера и мономера могут быть высушены, например, в SpeedVac и восстановлены в

растворе, содержащем 8 М мочевины, 5 мМ дитиотреитол (DTT) и 0,1 М Трис-НСl (рН 7,5), перед картированием триптического пептида. Денатурированные и восстановленные образцы могут быть алкилированы с помощью 10 мМ йодацетамида (IAA) в темноте в течение 30 мин. Растворы образцов затем могут быть разбавлены 0,1 М Трис-НСl (рН 7,5) для снижения концентрации мочевины и расщеплены трипсином при соотношении фермента к субстрату 1:20 (мас./мас.) при 37°C в течение ночи. Переваривание может быть остановлено добавлением 10% муравьиной кислоты (FA) к каждому образцу расщепленного белка. Затем образцы могут быть разделены с помощью обращенно-фазовой УЭЖХ с последующим онлайн-масс-спектрометрическим анализом для определения массы пептидов и подтверждения идентичности пептидов. В одном варианте осуществления эксперименты MS и MS/MS проводят на системе Thermo Q Exactive Plus MS с использованием высокоэнергетической диссоциации от столкновений (HCD - higher-energy collisional dissociation) для фрагментации пептидов во время экспериментов MS/MS.

v) Идентификация и характеристика областей димеризации

В одном варианте осуществления для мечения карбоксильной группы для идентификации меченых GEE триптических пептидов данные ЖХ-МС/МС ищутся в базе данных или поисковой системе, содержащей соответствующую последовательность белка mAb с переменными модификациями GEE1 (+85.0522) и GEE2 (+57.0209) ограничено остатками Asp и Glu, например, с использованием программного обеспечения, такого как BYONIC™ (Protein Metrics). Для количественной оценки степени мечения GEE для каждого триптического пептида, содержащего остаток Asp/Glu, генерируют выделенные ионные хроматограммы (EIC - extracted ion chromatograms), основанные на m/z первого изотопного пика как пептида, меченного GEE, так и нативного пептида, и экстрагированные области пиков интегрируют. Процент каждого меченного GEE пептида рассчитывают, используя соответствующую площадь пика EIC относительно суммы площадей пиков меченого и нативного пептидов. В случае триптического пептида, содержащего несколько остатков Asp и Glu, меченые GEE пептиды, элюирующиеся при разных временах удержания, сначала исследуют на спектры MS/MS для подтверждения сайтов мечения, а затем соответствующие площади пиков EIC используют для вычисления сайта-специфического процента мечения. Наконец, степени мечения GEE сравнивают между фракцией димера и фракцией мономера для каждого триптического пептида или остатка. Области, которые демонстрируют меньшие степени мечения в фракции димера, чем в мономерной фракции, вероятно, вовлечены или находятся в непосредственной близости от области димеризации.

В одном варианте осуществления для мечения FPOP данные ЖХ-МС/МС сначала сравниваются с базой данных, содержащей соответствующую последовательность белка mAb со всеми известными продуктами окислительного мечения (табл. 1), чтобы идентифицировать все продукты/пептиды мечения. Сайты модификации на пептиде идентифицируют на основе информации MS/MS и подтверждают точным m/z, а степень модификации для определенного пептида рассчитывают как:

$$\text{Степень модификации} = \frac{\sum I_{ox}}{\sum I_{ox} + I}$$

где I_{ox} - интенсивность модифицированного пептида (окисление Met исключено из-за возможного окисления Met, введенного во время обработки немаркированного образца), а I - интенсивность немодифицированного пептида. Количественный анализ окислительного мечения на уровне остатков также проводят для пептидов, которые показали различия в степени модификации на уровне пептидов между димерами и мономерами и пептидами, содержащими остатки Met. Сайты модификации на пептиде определяются по информации MS2. В некоторых вариантах осуществления, где определение местоположения модификации одного остатка невозможно из-за ограниченной информации фрагментации от MS2 или из-за присутствия помех от совместного элюирования пептидных изомеров, указывается, что модификация происходит на множестве возможных остатков. Области, которые демонстрируют меньшие степени мечения в фракции димера, чем в мономерной фракции, вероятно, вовлечены или находятся в непосредственной близости от области димеризации.

В одном варианте осуществления предложен способ идентификации сайтов нековалентного взаимодействия или областей димеризации в белковом лекарственном продукте путем расщепления обогащенного образца димера белкового лекарственного препарата в нативных условиях ограниченного расщепления с образованием образца белковой лекарственной смеси, содержащей нековалентно связанные димерные субдомены (например, F(ab) димеры) и мономерные субдомены и введение пригодных для обнаружения модификаций в димеры и мономеры образца белковой лекарственной смеси для получения модифицированных димеров и модифицированных мономеров. Способ включает разделение модифицированных димеров и модифицированных мономеров с использованием эксклюзионной хроматографии с нативным размером на фракции модифицированного димера и модифицированного мономера и расщепление множества пептидных связей фракций модифицированного димера и модифицированного мономера с образованием образцов расщепленного пептида. Способ также включает анализ образцов расщепленного пептида с использованием жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии для получения данных масс-спектрометрии образцов расщепленного пептида и определения сайтов модификации расщепленных пептидов в образце расщепленного пептида с использованием данных масс-спектрометрии рас-

щепленных пептидов по сравнению с известными данными масс-спектрометрии белкового лекарственного препарата, имеющего специфические модификации остатков, введенные в белковый лекарственный продукт.

В одном варианте осуществления димеры и мономеры модифицируются быстрым фотохимическим окислением с образованием пригодных для обнаружения окислительных модификаций в димеры и мономеры. Модификация может представлять собой модификацию боковой цепи аминокислоты.

Как отмечено выше, белковый лекарственный продукт может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, рекомбинантный белок, слитый белок или их комбинацию. Предпочтительным белковым лекарственным препаратом является моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В одном варианте осуществления эксклюзионную хроматографию с нативным размером проводят с использованием подвижной фазы, содержащей ацетат аммония и бикарбонат аммония. В другом варианте осуществления образец расщепленного белка разделяют жидкостной хроматографией с обращенной фазой.

В одном варианте осуществления модификация выбрана из группы, состоящей из окисления, диокисления, триокисления, кинуренина, дитиометила, декарбок্সилирования, гидрозикинурина и их комбинаций.

Как правило, белковый лекарственный продукт расщепляется ферментом, например расщепляется протеазой. Типичные протеазы, используемые при ограниченном расщеплении, включают, но не ограничиваются ими, папаин, фикаин, эндопротеазу Lys-C и IdeS. Типичные протеазы, используемые для расщепления пептидной связи для образования множества пептидов, включают, но не ограничиваются ими, трипсин, химотрипсин, пепсин и rLys-C.

В некоторых вариантах осуществления образец белкового лекарственного продукта происходит из периодической культуры с подпиткой.

В. Способы получения белковых лекарственных препаратов, обладающих уменьшенным нековалентным взаимодействием или агрегацией

Один из вариантов осуществления обеспечивает способ получения антитела, включающий стадии культивирования клеток, продуцирующих антитело, в подходящих условиях для получения антитела; очистку антитела в подходящих условиях для извлечения антитела; смешивание антитела с наполнителями в подходящих условиях для стабилизации антитела; получение образца антитела i) из культуры клеток, ii) после очистки антитела из культуры клеток или iii) после добавления эксципиентов к очищенному антителу; характеризацию области димеризации в антителе, используя системы и способы, раскрытые в данном документе, и модификацию условий для получения антитела или модификацию областей димеризации антитела, чтобы иметь уменьшенную димеризацию и нековалентное взаимодействие относительно немодифицированного антитела. Модификация условий для получения антитела объяснена выше.

В одном варианте осуществления модификация может представлять собой консервативную аминокислотную замену или химическую модификацию областей димеризации.

Примеры

Пример 1. Одиночное мечение смеси димеров и мономеров с помощью ковалентного мечения

Способы

Ограниченное расщепление mAb-1

mAb-1, изотип IgG1, расщепляли на фрагменты F(ab) и Fc в нативных условиях эндопротеазой LysC. Димер mAb-1 сначала разбавляли до 1 мкг/мкл в 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5), а затем инкубировали с эндопротеазой Lys-C (белок:фермент=400:1) при 37°C в течение 1 ч. Эта обработка с ограниченным расщеплением, в частности, расщепляет тяжелую цепь с остатком Lys, который является N-концом двух дисульфидных связей шарнирной области, что приводит к образованию как фрагментов F(ab), так и Fc. Любые нековалентные димерные взаимодействия (чаще всего F(ab)-F(ab)) от димерных видов сохраняются в смеси.

Ограниченное расщепление mAb-2

mAb-2 и изотип IgG4 расщепляли на фрагменты F(ab')₂ и Fc* в нативных условиях с помощью FabRICATOR®, ферментом IdeS из *Streptococcus pyogenes*. Димер mAb-2 сначала разбавляли до 1 мкг/мкл в 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), а затем расщепляли с помощью FabRICATOR® (1 IUB миллиединиц на 1 мкг белка) при 37°C в течение 1 ч. Эта ограниченная обработка расщеплением, в частности, расщепляет между двумя остатками Gly, сайтом, который является C-концом двух дисульфидных связей шарнирной области. Эта обработка привела к образованию одного фрагмента F(ab')₂ и двух идентичных фрагментов Fc/2, которые связаны друг с другом посредством нековалентных взаимодействий (Fc*). Затем смесь расщепления инкубируют с 5 мМ дитиотреитола (ДТТ) при 37°C в течение 30 мин, что уменьшает межцепочечные дисульфидные связи, сохраняя при этом внутрицепочечные дисульфидные связи нетронутыми. В результате фрагменты Fab₂ восстанавливаются на два фрагмента F(ab'), а Fd и LC связываются вместе посредством нековалентного взаимодействия. Нековалентные димерные взаимодействия (чаще всего

F(ab')-F(ab'')) из видов димеров также поддерживаются в смеси.

Полученная выше смесь фрагментов mAb и нековалентно связанных димеров фрагментов сначала заменяется буфером на 1 × PBS (pH 7,4) до ~ 2 мг/мл.

Мечение карбоксильной группы

Отпечаток карбоксильной группы - это широко используемая методика ковалентного мечения для изучения конформации и взаимодействия белков путем мечения боковых цепей остатков Asp и Glu с помощью GEE. В реакции мечения GEE карбоксильные группы из остатков Asp и Glu, расположенные на поверхности белка, легко модифицируются, тогда как те, которые погребены во внутренней структуре белка, модифицируются меньше или даже не модифицируются. Для проведения мечения 100 мкл расщепленного образца mAb-1 смешивают с 50 мкл 0,2 М 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид гидрхлорида (EDC) и 50 мкл 2 М гидрхлорида этилового эфира глицина (GEE) и выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч. После гашения реакции мечения GEE путем добавления 500 мкл 1М Трис-НСl (pH 8) раствор образца концентрируют центрифугированием с использованием центробежного фильтра Ultracel-10K до примерно 40 мкл.

Быстрое фотохимическое окисление белков (FPOP)

FPOP - это хорошо разработанный метод мечения гидроксильных радикалов, который метит белок в боковой цепи аминокислотного остатка в микросекундном масштабе времени, и широко применяется для изучения взаимодействий белок-белок/лиганд. В процессе мечения 50 мкл вышеуказанной смеси, после замены буфера, сначала смешивали с 1xPBS и концентрированным His-раствором, и стоковым раствором H₂O₂, чтобы получить конечные 100 мкл раствора, содержащего 1 мг/мл mAb-2 смеси для расщепления, 350 мкМ His и 20 мМ H₂O₂. H₂O₂ был добавлен непосредственно перед закачкой раствора в трубки для FPOP. Образец загружали в газонепроницаемый шприц объемом 100 мкл и вводили через шприцевой насос, соединенный с трубкой из плавленного кварца с внутренним диаметром 150 мкм, с прозрачным окном в центре, обращенным к лазерному лучу. Мощность эксимерного лазера на K₂F была установлена на 100-120 мДж/импульс, а частота его импульсов была установлена на 6 Гц. Ширина лазерного луча в прозрачном окне пробоотборной трубки составила 3,0 мм. После включения импульсного лазера раствор образца вводили в трубку со скоростью потока 23,86 мкл/мин (отрегулированной в соответствии с внутренним диаметром трубки, частотой лазера и измеренной шириной лазерного луча), чтобы обеспечить объем исключения 20%, чтобы избежать повторного ·ОН воздействия и реакции. Капиллярный отток собирали во флакон, содержащий 20 мкл 100 мМ Met и 2 мкл 1 мг/мл каталазы для уменьшения остаточного H₂O₂. Наконец, раствор меченого образца концентрировали центрифугированием с использованием центробежного фильтра ultracel-10K до примерно 40 мкл.

SEC/МС

Смесь образцов с ковалентной меткой вводили в колонку ВЕН® SEC (300 мм×4,6 мм, 200 Å, 1,7 мкм), которую предварительно уравнивали подвижной фазой (140 мМ ацетат аммония и 10 мМ бикарбонат аммония, pH 7,4) со скоростью потока 0,2 мл/мин. После разделения SEC и УФ-детекции (280 нм) димерный и мономерный фрагменты собирали для анализа картирования триптического пептида.

Картирование пептидов

Перед триптическим расщеплением все димерные и мономерные фракции высушивали в SpeedVac и восстанавливали в растворе, содержащем 8 М мочевины, 5 мМ дитиотреитол (DTT) и 0,1 М Трис-НСl (pH 7,5), и хранили при 50°C в течение 30 мин. Денатурированные и восстановленные образцы алкилировали 10 мМ йодацетамидом (IAA) в темноте в течение 30 мин. Растворы образцов затем разбавляли в десять раз 0,1 М Трис-НСl (pH 7,5), чтобы снизить концентрацию мочевины до 0,8 М, и расщепляли трипсином при соотношении фермента к субстрату 1:20 (мас./мас.) при 37°C на ночь. Расщепление затем останавливали добавлением 10% FA, чтобы получить конечные 0,2% FA. Аликвоты (~ 5 мкг) каждого образца расщепленного белка затем разделяли с помощью обращенно-фазовой УЭЖХ с последующим онлайн-масс-спектрометрическим анализом для определения массы пептидов и подтверждения идентичности пептидов. МС и МС/МС эксперименты проводились на системе Thermo Q Exactive Plus MS с использованием высокоэнергетической диссоциации от столкновений (HCD) для фрагментации пептидов во время МС/МС экспериментов.

Результаты

Мечение карбоксильной группы

Для мечения карбоксильной группы, чтобы идентифицировать триптические пептиды, меченные GEE, данные ЖХ-МС/МС сравнивали с базой данных, содержащей соответствующую последовательность белка mAb с переменными модификациями GEE1 (+85.0522) и GEE2 (+57.0209), ограниченными Asp и Glu остатками. Для количественного определения степени мечения GEE для каждого триптического пептида, содержащего остаток Asp/Glu, были получены экстрагированные ионные хроматограммы (EIC), основанные на м/з первого изотопного пика как пептида, меченого GEE, так и нативного пептида, и экстрагированные площади пиков были интегрированы. Процент каждого меченого GEE пептида рассчитывали с использованием соответствующей площади пика EIC относительно суммы площадей пиков меченого и нативного пептидов. В случае триптического пептида, содержащего множественные

остатки Asp и Glu, меченые GEE пептиды, элюирующиеся при разных временах удерживания, сначала исследовали на спектры МС/МС для подтверждения сайтов мечения, а затем соответствующие площади пиков EIC использовали для вычисления сайта с определенным процентом мечения. Наконец, степени мечения GEE сравнивали между фракцией димера и фракцией мономера для каждого триптического пептида или остатка. Области, которые демонстрируют меньшие степени мечения в фракции димера, чем в мономерной фракции, вероятно, вовлечены или находятся в непосредственной близости от области димеризации (фиг. 2, 3А и 3В).

Мечение FPOP

Для мечения FPOP данные ЖХ-МС/МС сначала были найдены в базе данных, содержащей соответствующую последовательность белка mAb со всеми известными продуктами окислительного мечения (табл. 1), чтобы идентифицировать все продукты мечения. Сайты модификации на пептиде были идентифицированы на основе информации МС/МС и подтверждены точным м/з, а степень модификации для определенного пептида была рассчитана как:

$$\text{Степень модификации} = \frac{\sum I_{ox}}{\sum I_{ox} + I},$$

где I_{ox} - интенсивность для модифицированного пептида (исключено окисление Met из-за возможного окисления на Met, введенном во время обработки немаркированного образца), а I - интенсивность для немодифицированного пептида. Количественный анализ окислительного мечения на уровне остатка также был выполнен для пептидов, которые показали различия в степени модификации на уровне пептидов между димерами и мономерами и пептидами, содержащими остатки Met. Сайты модификации на пептиде были назначены с информацией из МС2. В некоторых случаях, когда локализация модификации одного остатка была невозможна из-за ограниченной информации о фрагментации от МС2 или из-за присутствия помех от совместного элюирования пептидных изомеров, было продемонстрировано, что модификация происходит на ряде возможных остатков. Распределение Пуассона маркирующих видов +0, +16, +32, +48 и т. д. на уровне подмонов указывает на отсутствие чрезмерного мечения (фиг. 4А-4С). Области, которые демонстрируют меньшие степени мечения в фракции димера, чем в мономерной фракции, вероятно, вовлечены или находятся в непосредственной близости от области димеризации (фиг. 5А и 5В).

Таблица 1. Возможные продукты окислительного мечения

модификация		Реактивные остатки	Изменение массы
Регулярные	Окисление	M, C, H, W, F, Y, I, L, V, R, K, E, Q, D, N, S, A, P	+ 15,9949
	Диоксидирование	M, C, W, Y, F	+ 31,9898
	Триоксидирование	C, W, Y, F	+ 47,9847
	Кинуренин	W	+ 3,9949
	Карбонилирование	W, I, L, P, K, E, Q, V, R	+ 13,9793
	M+34	M	+ 33,9691
Редкие	H-22	H	- 22,0320
	H-23	H	- 23,0160
	H-10	H	- 10,0320
	H-66	H	- 66,0218
	H+5	H	+ 4,9789
	C-16	C	- 15,9772
	M-32	M	- 32,0085
	P-43	p	- 43,0534
	Детиметил	M	- 48,0034
	СТ-2	S, T	- 2,0157
	Декарбоксилирование	D, E, P	- 30,0106
	Pro-> Glu	p	+ 31,9898
	Гидроксикинуренин	W	+ 19,9898

Пример 2. Оптимизация FPOP

Способы:

Придерживались протокола FPOP из примера 1. Различные компоненты протокола, то есть положение лазера, концентрация поглотителя и включение гасителей, манипулировали, чтобы определить их влияние на анализ.

Результаты

В табл. 2 приведены экспериментальные параметры для фиг. 6А и 6В. Как видно на фиг. 6А и 6В, положение и мощность лазера влияют на эффективность мечения белка лизоцима. Окисленные частицы в образце, который был проанализирован с использованием параметров, показанных на фиг. 6В, включая

более близкое положение фокусировки и мощность лазера 122 мДж, демонстрируют хорошее соответствие +0, +16, + 32... состояния распределения продукта распределению Пуассона. Это свидетельствует о повышении эффективности мечения.

Таблица 2. Экспериментальные параметры

Положение фокусировки	Позиция 1 (далее, больше фокусировки)	Положение 2 (ближе, меньше фокусировки)
Концентрация белка	0,2 мг/мл	0,2 мг/мл
Мощность лазера	168 мДж	122 мДж
Поглотитель	350 мкМ His	350 мкМ His

Как продемонстрировано датой распределения Пуассона на фиг. 7А-7Г и 8А-8Д, мощность лазера и концентрация поглотителя влияют на эффективность мечения белка на гораздо более высоком уровне, чем концентрация белка.

Дегликозилированный mAb1 без замены буфера демонстрирует пониженную степень мечения (фиг. 9В) по сравнению с mAb1, подвергнутым замене буфера (фиг. 9А). Это говорит о том, что гасители могут мешать окислительной маркировке белка.

Хотя в вышеприведенном описании это изобретение было описано применительно к его конкретным вариантам осуществления и было дано много подробностей с целью иллюстрации, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что данное изобретение допускает дополнительные варианты осуществления и что некоторые из деталей, описанных в данном документе, могут значительно варьироваться без отклонения от основных принципов данного изобретения.

Все ссылки, упомянутые в данном описании, включены в него в качестве ссылок во всей их полноте.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации сайтов нековалентного взаимодействия или областей димеризации в белковом лекарственном продукте, включающий

использование ограниченного ферментативного расщепления белкового лекарственного продукта в условиях, при которых образуется смесь образцов димера белкового лекарственного средства, содержащая мономеры и нековалентно связанные димеры;

введение пригодных для обнаружения модификаций в димеры и мономеры смеси образцов димеров белкового лекарственного средства для получения модифицированных димеров и модифицированных мономеров, где указанные пригодные для обнаружения модификации вводят посредством быстрого фотохимического окисления белков;

разделение модифицированных димеров и модифицированных мономеров с использованием хроматографии с исключением по размеру на фракции модифицированного димера и модифицированного мономера;

расщепление фракций модифицированного димера и модифицированного мономера с образованием образцов пептидов;

разделение указанных образцов пептидов с использованием жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ЖХ-МС) для получения данных масс-спектрометрии указанных образцов пептидов;

определение сайтов модификации каждого пептида в образцах пептидов с использованием данных масс-спектрометрии указанных пептидов по сравнению с известными данными масс-спектрометрии указанного белкового лекарственного продукта путем расчета массы каждого пептида и модифицированного пептида такого белкового лекарственного продукта.

2. Способ по п.1, где нативные условия ограниченного расщепления сохраняют дисульфидные связи между полипептидами и нековалентные взаимодействия между димерами.

3. Способ по п.1 или 2, где указанный белковый лекарственный продукт содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, рекомбинантный белок, слитый белок или их комбинацию.

4. Способ по любому из пп.1-3, где указанный белковый лекарственный продукт представляет собой антитело и димеры в смеси состоят, по существу, из двух взаимодействующих F(ab') или F(ab) фрагментов.

5. Способ по любому из пп.1-4, где указанный белковый лекарственный продукт представляет собой антитело и мономеры в смеси состоят, по существу, из F(ab) фрагментов и Fc фрагментов.

6. Способ по любому из пп.1-5, где указанная модификация представляет собой модификацию боковой цепи аминокислоты.

7. Способ по любому из пп.3-6, где антитело представляет собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело или их антигенсвязывающий фрагмент.

8. Способ по любому из пп.1-7, где нативную хроматографию с исключением по размеру проводят с использованием подвижной фазы, содержащей ацетат аммония и бикарбонат аммония.

9. Способ по любому из пп.1-8, где образец расщепленного белка разделяют жидкостной хроматографи-

ей с обращенной фазой.

10. Способ по любому из пп.1-9, где указанная модификация выбрана из группы, состоящей из окисления, двойного окисления, тройного окисления, кинуренина, дитиометила, декарбоксихлирования, гидроксихлирования и их комбинаций.

11. Способ по п.1 или 2, где белковый лекарственный продукт расщепляют ферментом.

12. Способ по п.11, где указанный фермент выбран из группы, состоящей из папаина, фикаина, эндопротеазы Lys-C и IdeS или их модифицированной формы.

13. Способ по п.1, где фракции модифицированного димера и модифицированного мономера расщепляют ферментом, который разрывает ковалентные химические связи, связывающие два последовательных аминокислотных остатка, для образования пептидов.

14. Способ по любому из пп.1-13, где образец белкового лекарственного продукта получают из периодической культуры с подпиткой, из стадии процесса очистки или из приготовленной лекарственной субстанции.

15. Способ получения антитела, включающий культивирование клеток, продуцирующих антитело, в культуре клеток; очистку антитела для извлечения антитела; смешивание антитела с эксципиентами для стабилизации антитела; получение образца антитела i) из культуры клеток, ii) после очистки антитела из культуры клеток или iii) после добавления эксципиентов к очищенному антителу;

характеризацию областей димеризации или сайтов нековалентного взаимодействия антитела в соответствии со способом по любому из пп.1-14 и

модифицирование одной или более клеточных культур, условий очистки или эксципиентов для уменьшения количества димеризации или нековалентного взаимодействия антитела.

16. Способ по п.15, где указанные одно или более условий, которые изменяют для уменьшения количества димеризации или нековалентного взаимодействия, выбирают из группы, состоящей из pH, плотности клеток, концентрации аминокислот, осмоляльности, концентрации факторов роста, перемешивания, растворенного кислорода, ионов металлов, парциального давления газа, аффинного матрикса, хроматографической смолы, буфера, поверхностно-активного вещества, стабилизатора или их комбинаций.

17. Способ по п.15 или 16, где указанные клетки выбраны из группы, состоящей из бактериальных клеток, дрожжевых клеток, клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток COS, клеток сетчатки, клетки Vero, клеток CV1, клеток почек, клеток HeLa, клеток HepG2, клеток WI38, клеток MRC 5, клеток Colo25, HB 8065 клеток, клеток HL-60, клеток лимфоцитов, A431 (эпидермальных) клеток, клеток U937, клеток 3T3, L-клеток, клеток C127, клеток SP2/0, клеток NS-0, клеток ММТ, стволовых клеток, опухолевых клеток и клеточной линии, полученной из любых вышеупомянутых клеток.

18. Способ по п.15 или 16, где клетки представляют собой клетки гибридомы или клетки квадромы.

19. Способ получения модифицированного антитела, включающий характеризацию областей димеризации или сайтов нековалентного взаимодействия в антителе с использованием способа по любому из пп.1-14 и

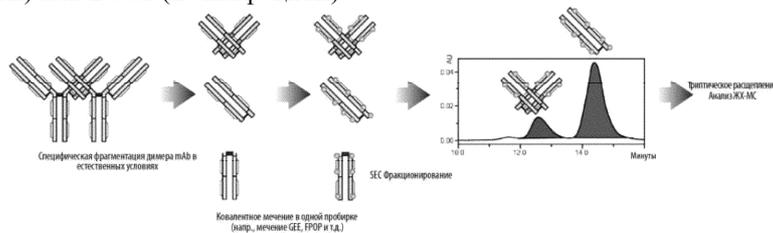
модифицирование аминокислот в областях димеризации или сайтах нековалентного взаимодействия для уменьшения димеризации или нековалентного взаимодействия антитела.

20. Способ по п.17, где клетки CHO представляют собой клетки CHO K1, DXB-11 CHO или Veggio-CHO.

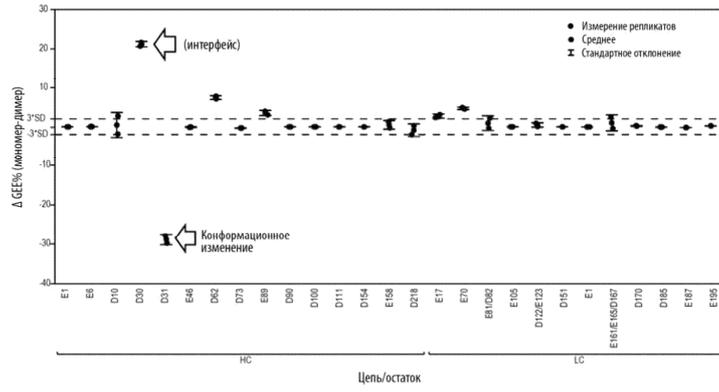
21. Способ по п.17, где клетки COS представляют собой клетки COS-7.

22. Способ по п.17, где клетки почек представляют собой клетки HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK или VHK21.

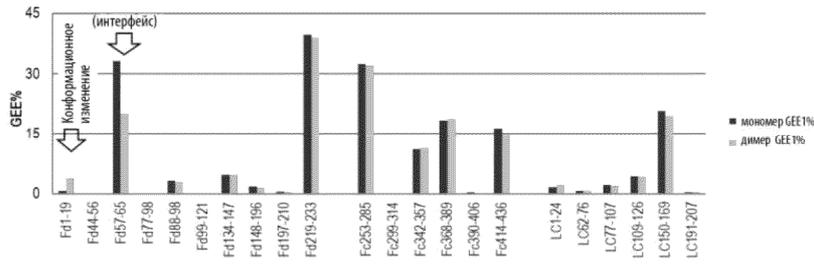
23. Способ по п.17, где клетки лимфоцитов представляют собой аутологичные Т-клетки, клетки Jurkat (Т-лимфоциты) или Daudi (В-лимфоциты).



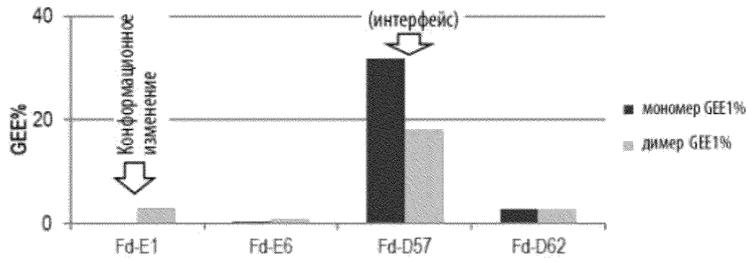
Фиг. 1



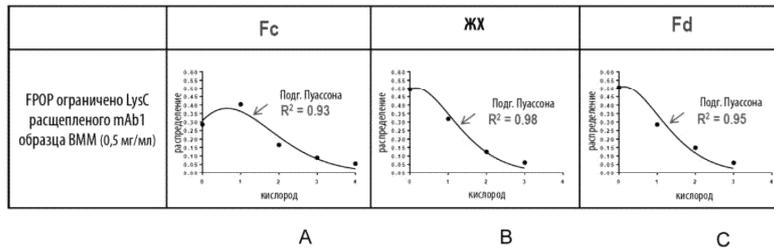
Фиг. 2



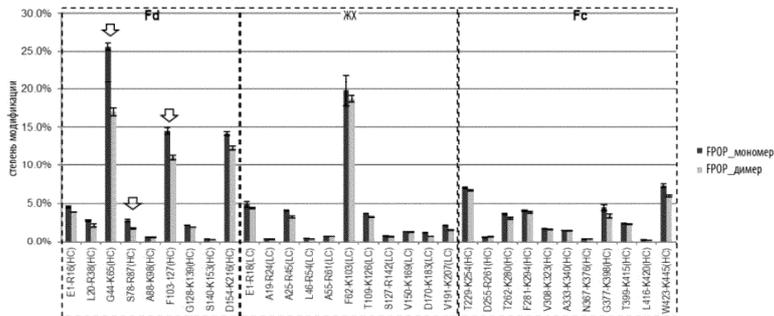
Фиг. 3А



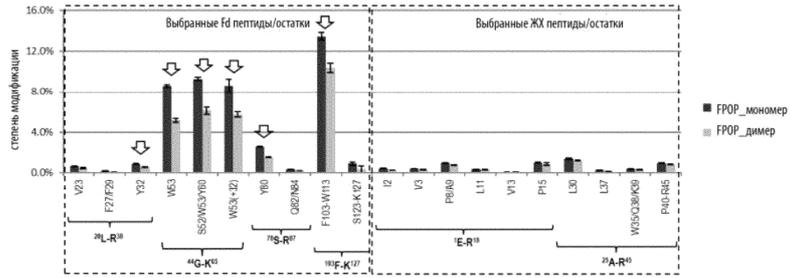
Фиг. 3В



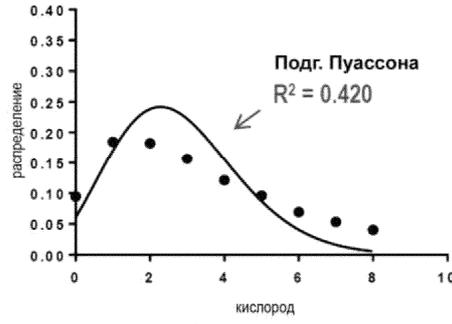
Фиг. 4



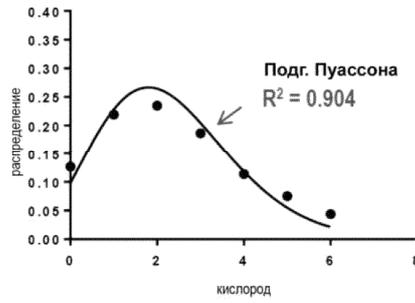
Фиг. 5А



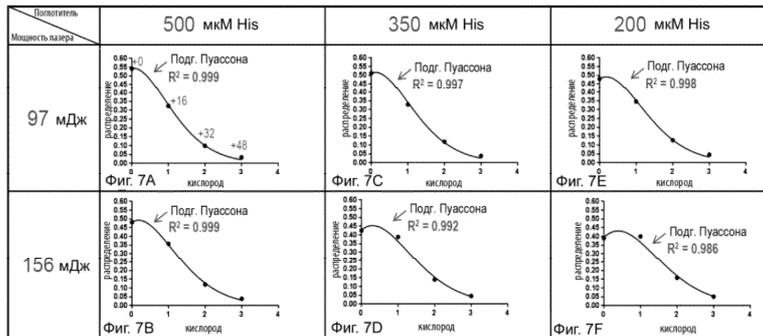
Фиг. 5В



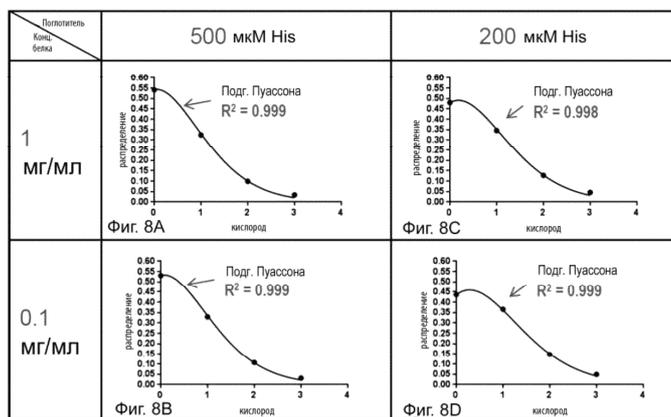
Фиг. 6А



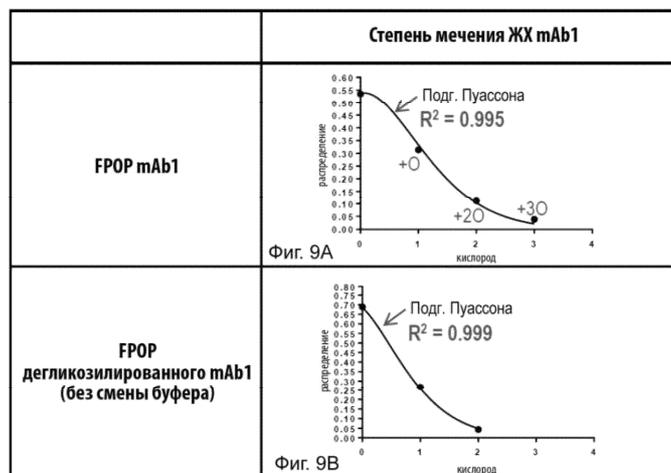
Фиг. 6В



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2