

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292786** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.05.31**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.08.08**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 38/14* (2006.01)  
*B01D 15/32* (2006.01)  
*B01D 15/42* (2006.01)  
*G01N 13/00* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ИНДИВИДУАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ИЗ СМЕСИ**

---

(31) **62/375,887**

(32) **2016.08.16**

(33) **US**

(62) **201990317; 2017.08.08**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Лю Динцзян, Ло Линь (US), Сюй Лун (CN)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Изобретение относится, среди прочего, к способу определения количества молекулы антитела в смеси, содержащей две или более молекул антитела, причем способ включает отделение каждой из двух или более молекул антитела из смеси с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC) и определение количества каждой молекулы антитела, где молекулярная масса каждой молекулы антитела находится в диапазоне 15 кДа относительно любой другой молекулы антитела в смеси, и каждая молекула антитела отличается от другой молекулы антитела в смеси на более чем примерно 0,25 единиц по шкале гидропатии Кайта и Дулиттла, или каждая молекула антитела при хроматографировании по отдельности с помощью HIC-HPLC элюируется через различное время хроматографирования с небольшим перекрытием относительно других молекул антитела в смеси, или и то и другое.

**202292786**

**A1**

**A1**

**202292786**

**СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА ИНДИВИДУАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ИЗ СМЕСИ**

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 62/375,887, поданной 16 августа 2016 года, которая полностью включена в настоящий документ ссылкой.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее раскрытие относится к области анализов составов терапевтических антител.

## Уровень техники

Введение множества, а не одиночных моноклональных антител (mAb) пациенту может улучшить их диагностические или терапевтические показания и эффективность. Эти mAb могут быть введены в состав одного лекарственного средства (DP), и DP может вводиться пациенту.

Регулирующим органам требуется способ количественного определения индивидуальных mAb в комбинированной лекарственной субстанции (cFDS) для включения в DP или в самом DP. Разработка способа разделения двух или более молекул антитела и измерения концентрации каждого mAb является сложной задачей, поскольку молекулы антитела могут иметь сходные молекулярные массы, структуры белка и свойства заряда.

## Сущность изобретения

Это раскрытие включает способ определения количеств антител из смеси, содержащей множество антител. В некоторых аспектах способ может включать, среди прочего, разделение каждого из множества антител в смеси с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC) и определение количества каждого антитела в смеси, где молекулярная масса каждого антитела в смеси находится в пределах 15 кДа молекулярной массы относительно любых других антител в смеси, и либо гидрофобность поверхности каждого антитела в смеси отличается от гидрофобности поверхности другого антитела в смеси более чем примерно на 0,25 единиц по шкале гидропатии Кайта и Дулиттла, либо каждое антитело в смеси при хроматографировании с помощью HIC-HPLC по

отдельности элюируется через время, отличное от времени хроматографирования для другого антитела в смеси, или и то, и другое.

В некоторых вариантах осуществления гидрофобность поверхности каждого антитела в смеси отличается от гидрофобности поверхности каждого другого антитела в смеси примерно на 0,5-1 единиц по шкале гидропатии Кайта и Дулиттла. В других вариантах осуществления гидрофобность поверхности каждого антитела в смеси определяется путем расчета гидрофобности поверхности на основе структуры белка или структурной модели, быстрого скрининга на растворимость в сульфате аммония или PEG8000 или быстрого скрининга взаимодействия молекул посредством спектроскопии аффинного захвата самовзаимодействия на наночастицах (AC-SINS).

В дополнительных вариантах осуществления первое антитело в смеси элюируется через первое время хроматографирования в ходе хроматографирования с помощью HIC-HPLC, второе антитело в смеси элюируется через второе время хроматографирования в ходе хроматографирования с помощью HIC-HPLC, и причем первое и второе время хроматографирования не перекрываются. В дополнительных вариантах осуществления первое антитело в смеси и второе антитело в смеси имеют белковые последовательности, которые являются по меньшей мере на 90% гомологичными, первое антитело и второе антитело имеют белковые структуры, которые по меньшей мере на 90% гомологичны, что определяется по их белковым последовательностям, или первое антитело и второе антитело имеют изоэлектрические точки (pI) в пределах 0,6 относительно друг друга, что определяется их белковыми последовательностями.

В некоторых вариантах осуществления множество антител включает три антитела. В других вариантах осуществления одно или более антител в смеси представляют собой моноклональные антитела. В других дополнительных вариантах осуществления одно или более антител в смеси представляют собой моноклональные антитела человека. В других вариантах осуществления два или более антител в смеси имеют один и тот же изотип. В некоторых вариантах осуществления два или более антител в смеси являются вариантами друг друга. В других вариантах осуществления два или

более антител в смеси связываются с одним и тем же антигеном.

В некоторых вариантах осуществления смесь представляет собой комбинированную композицию. В дополнительных вариантах осуществления комбинированная композиция скомпонована для лечения MERS у пациента-человека. В других вариантах осуществления комбинированная композиция скомпонована для лечения геморрагической лихорадки Эбола у пациента-человека. В других вариантах осуществления комбинированная композиция скомпонована для лечения макулярной дегенерации у пациента-человека. В других дополнительных вариантах осуществления два или более антител в комбинированной композиции скомпонованы для лечения инфекционного заболевания у пациента-человека. В некоторых вариантах осуществления комбинированную композицию включают в лекарственный продукт.

В некоторых вариантах осуществления HIC-HPLC выполняют в буфере при pH примерно от 5 примерно до 7. В других вариантах осуществления способ дополнительно включает создание хроматограммы HIC-HPLC, отличающийся тем, что для элюирования каждого антитела в смеси, хроматограф демонстрирует пик, который не перекрывается с другими пиками в хроматограмме.

Настоящее раскрытие также включает способ определения количеств антител из смеси, содержащей множество антител, причем способ включает: разделение каждого из множества антител в смеси с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC), где молекулярная масса каждого антитела в смеси находится в пределах 15 кДа относительно молекулярной массы каждого другого антитела в смеси; количественное определение количества каждого антитела в смеси; и создание хроматограммы HIC-HPLC, где для элюирования каждого антитела в смеси хроматограмма демонстрирует пик, который не перекрывается с другими пиками в хроматограмме. В некоторых вариантах осуществления одно или более из множества антител представляют собой моноклональные антитела человека. В других вариантах осуществления либо гидрофобность поверхности каждого антитела в смеси отличается от гидрофобности поверхности другого антитела в смеси более чем примерно на 0,25 единиц по

шкале гидропатии Кайта и Дулиттла, либо каждое антитело в смеси при хроматографировании с помощью НИС-НPLC по отдельности элюируется через времена хроматографирования, отличное от времени для другого антитела в смеси, или и то, и другое.

Многочисленные другие аспекты и варианты осуществления предложены в соответствии с этими и другими аспектами раскрытия. Другие особенности и аспекты настоящего раскрытия станут более понятными из следующего подробного описания и прилагаемой формулы изобретения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Прилагаемые чертежи, которые включены и составляют часть настоящего описания, иллюстрируют различные примеры и вместе с описанием служат для объяснения принципов настоящего раскрытия. Любые признаки варианта осуществления или примера, описанного в настоящем документе (например, устройство, способ и т.д.), могут быть объединены с любым другим вариантом осуществления или примером и охватываются настоящим раскрытием.

ФИГ. 1 демонстрирует иллюстративную хроматограмму НИС-НPLC хроматографирования комбинированного состава, содержащего mAb против вируса Эбола.

ФИГ. 2-8 демонстрируют иллюстративные хроматограммы НИС-НPLC хроматографирования комбинированного состава, содержащего mAb против MERS.

ФИГ. 9 демонстрирует иллюстративную хроматограмму НИС-НPLC хроматографирования комбинированного состава, включающего mAb против вируса Эбола.

ФИГ. 10 представляет собой график линейности НИС-НPLC, на котором нанесены данные площади пика от количества отдельного хроматографирования mAb против вируса Эбола.

ФИГ. 11 представляет собой график диапазона, представляющий процент восстановления mAb по отношению к количеству отдельного хроматографирования mAb против вируса Эбола.

ФИГ. 12 представляет собой график точности НИС-НPLC с различными лотами образцов смесей, на котором представлен процент извлечения mAb в зависимости от количества отдельного хроматографирования mAb против Ebola.

ФИГ. 13 представляет собой график точности HIC-HPLC с различными соотношениями отдельных mAb против вируса Эбола, на котором представлен процент извлечения mAb в зависимости от количества отдельного хроматографирования mAb против вируса Эбола.

ФИГ. 14 представляет собой график стабильности mAb при хранении в cFDS, график зависимости количества отдельных mAb против вируса Эбола от времени хранения в месяцах.

ФИГ. 15 демонстрирует примерную хроматограмму при хроматографировании на катионообменной жидкостной хроматографии сверхвысокого давления (CEX-UPLC) комбинированного состава, содержащего mAb против Эболы.

ФИГ. 16 представляет собой график линейности CEX-UPLC, график зависимости площади пика от количества индивидуального mAb против вируса Эбола.

ФИГ. 17 демонстрирует примерную хроматограмму при хроматографировании с помощью эксклюзионной жидкостной хроматографии сверхвысокого давления (SE-UPLC) комбинированного состава, содержащего mAb против вируса Эбола.

ФИГ. 18 демонстрирует примерный профиль капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией изображения с детекцией непосредственно в капилляре (iCIEF) комбинированного состава, содержащего mAb против вируса Эболы.

ФИГ. 19 демонстрирует примерную хроматограмму жидкостной хроматографии сверхвысокого давления с обращенной фазой (RP-UPLC) комбинированного состава, содержащего mAb против вируса Эболы.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Термин «антитело» иногда используют взаимозаменяемо с термином «иммуноглобулин». Вкратце, он может относиться к цельному антителу, содержащему два полипептида легкой цепи и два полипептида тяжелой цепи. Цельные антитела включают различные изоформы антител, включая антитела IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Термин «антитело» может включать, например, поликлональное антитело, моноклональное антитело (mAb), химеризованное или химерное антитело, гуманизированное антитело, приматизированное

антитело, деиммунизированное антитело и полностью человеческое антитело. Антитело может быть получено или получено из любого из множества видов, например, млекопитающих, таких как люди, приматы, отличные от человека (например, орангутаны, бабуины или шимпанзе), лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки, кролики, морские свинки, песчанки, хомяки, крысы и мыши. Антитело может быть очищенным или рекомбинантным антителом. Антитело также может быть сконструированным белком или антителоподобным белком, содержащим по меньшей мере один домен иммуноглобулина (например, химерный белок). Сконструированный белок или антителоподобный белок также может представлять собой биспецифичное антитело или триспецифичное антитело или димерное, тримерное или мультимерное антитело или диатело, DVD-Ig, CODV-Ig, Affibody® или Nanobody®.

Термины «вариант антитела», «антительный вариант» и тому подобное относятся к антителу, которое отличается от другого антитела тем, что вариантное антитело представляет собой вариант по делеции, вариант по вставке и/или вариант по замене другого антитела.

Используемый в настоящем описании термин «человеческое антитело» предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие mAb могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин «человеческое антитело», используемый в настоящем документе, не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были трансплантированы на последовательности FR человека. Термин включает антитела, рекомбинантно продуцируемые у млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося

человеком. Термин не предназначен для включения антител, выделенных из или продуцируемых человеком.

Используемые в настоящем документе термины «проводить лечение», «лечить» или «лечение» относятся к уменьшению или ослаблению тяжести, по меньшей мере, одного симптома или признака заболевания или состояния вследствие введения комбинированного состава из двух или более антител объекту, нуждающемуся в этом. Термины включают ингибирование прогрессирования заболевания. Термины также включают положительный прогноз заболевания.

Термины «осуществлять предотвращение», «предотвращать» или «предотвращение» относятся к ингибированию проявления заболевания или состояния, любых симптомов или признаков этого заболевания или состояния при введении комбинированного состава двух или более антител.

Для терминов «например» и «такие как» и их грамматических эквивалентов следует понимать фразу «и без ограничений», если явно не указано иное. Используемый в настоящем документе термин «примерно» и обозначение «~» предназначены для учета изменений из-за экспериментальной ошибки. Все измерения, представленные в настоящем документе, понимаются как измененные термином «примерно» независимо от того, используется ли этот термин явно или нет, если явно не указано иное. При использовании в данном документе, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не предписывает иное.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которому относится настоящее изобретение. Способы и материалы описаны в настоящем документе для применения в настоящем изобретении; другие подходящие способы и материалы, известные в данной области, также могут быть использованы. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Все публикации, заявки на патенты, патенты, последовательности, записи в базе данных и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, включены

ссылкой в полном объеме. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

Молекулы антител, такие как молекулы моноклональных антител, могут быть совместно включены в комбинированный состав для лечения одного или более заболеваний или состояний у пациента (включая пациента-человека). Термины «пациент» и «объект» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

Комбинированный лекарственный продукт (DP) может включать комбинированное лекарственное вещество (cFDS) (также называемое в настоящем документе как комбинированный состав), содержащее две или более (например, три) молекулы моноклональных антител человека (mAb). cFDS готовят путем смешивания очищенных mAb в заданном соотношении. Регулирующие органы имеют потребность в способе количественного определения каждого из отдельных mAb в cFDS.

Молекулы mAb в комбинированной составе могут быть похожими друг на друга: они могут быть иммуноглобулинами (такими как IgG1) с примерно одинаковой молекулярной массой (например, ~ 145 кДа); с аналогичной структурой белка и свойствами заряда.

Раскрытые в настоящем документе способы количественного определения аналогичных молекул mAb в комбинированном составе являются точными, надежными, воспроизводимыми, пригодными для применения в средах контроля качества, не требуют дорогостоящего оборудования и не требуют громоздкой подготовки образцов.

#### Способы

В настоящем раскрытии предложены способы количественного определения количества молекулы антитела из смеси, содержащей две или более молекул антител. Способ может включать отделение каждой из двух или более молекул антител от смеси с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC) и определение количества каждой молекулы антитела, где молекулярная масса каждой молекулы антитела находится в пределах 15 кДа относительно любой другой молекулы антитела в смеси, и каждая молекула антитела отличается от другой молекулы антитела в смеси более чем на 0,25 единиц по шкале гидропатии Кайта и Дулиттла (См., например, Kyte and

Doolittle, J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)), или каждая из молекул антитела при хроматографировании отдельно на НИС-НPLC, элюируется через определенное время хроматографирования с небольшим перекрытием с другими молекулами антитела в смеси, или и то, и другое. В определенных вариантах осуществления, например, относительная гидрофобность каждой молекулы антитела отличается от каждой другой молекулы антитела в смеси примерно на 0,5-1 единиц по шкале гидропатии Кайта и Дулиттла. В некоторых других вариантах осуществления каждая из молекул антител при хроматографировании отдельно на НИС-НPLC, элюируется через определенное время хроматографирования с небольшим перекрытием относительно других молекул антител в смеси. В определенных вариантах осуществления смесь содержит множество молекул антител (например, две, три, четыре или пять молекул антител).

Если две молекулы антитела из смеси при проведении НИС-НPLC имеют значительное перекрытие по профилям элюирования хроматографического мониторинга молекул антитела по абсорбции в зависимости от времени элюирования, это указывает на то, что две молекулы антитела элюируются в моменты времени, которые близки, что приводит к утрате разделения на колонке, так что молекулы антитела не очищаются (например, с чистотой менее 50%). В таких случаях отдельные антитела не могут быть полностью количественно определены из-за этого значительного перекрытия. В некоторых вариантах осуществления две молекулы антитела из смеси при проведении НИС-НPLC практически не перекрываются в профилях элюирования хроматографического мониторинга молекул антитела по времени абсорбции в зависимости от времени элюции, поскольку молекулы антитела элюируются в моменты времени, которые не являются близкими, что приводит к разделению, так что молекулы антител по существу очищаются, и каждое из них имеет чистоту, по меньшей мере, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем документе, используются для количественного определения отдельной популяции антител, также называемых

«молекулами антител», из смеси антител, которая включает две или более разных популяций антител, где разные популяции имеют по меньшей мере одно аминокислотное отличие между ними. В некоторых вариантах осуществления популяция антител может иметь ту же аминокислотную последовательность, что и другая популяция антител в смеси, но они могут отличаться в посттрансляционных модификациях. В определенных вариантах осуществления смесь представляет собой комбинированную композицию, такую как или включающую комбинированное лекарственное вещество (cFDS). В определенных вариантах осуществления смесь включает вспомогательные вещества. В определенных вариантах осуществления смесь содержит сахарозу и может представлять собой лекарственное вещество с сахарозой, включающее молекулы mAb. Каждое антитело в смеси антител будет иметь одинаковую молекулярную массу в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 10 или 15 килодальтон (кДа) относительно друг от друга. В другом аспекте средняя молекулярная масса всех антител будет составлять около 150 кДа. Этот способ также можно использовать с двумя или более молекулами-ловушками, которые имеют одинаковую молекулярную массу. В некоторых дополнительных вариантах осуществления комбинированная композиция включает VEGF-Trap. (См., например, патент США № 9265827 и заявку на патент США № 14/943490, которые включены сюда ссылкой в полном объеме). Этот способ также может использоваться для контроля концентрации каждого из mAb в смеси (например, в комбинированном составе) при мониторинге стабильности при хранении. В некоторых вариантах осуществления этот способ используется для разделения молекул антител, которые не могут быть разделены другим хроматографическим способом, таким как жидкостная хроматография высокого давления с обращенной фазой (ВЭЖХ) или жидкостная хроматография сверхвысокого давления (UPLC).

Хроматография с гидрофобным взаимодействием (HIC) разделяет антитела в уменьшающемся градиенте соли, и основана на различиях в гидрофобности поверхности антител. Разделение с использованием HIC основано на обратимом взаимодействии между антителом и гидрофобным лигандом, связанным с хроматографической матрицей. Хотя гидрофобные аминокислоты белков и пептидов обычно

расположены вдали от поверхностей молекул, биомолекулы имеют некоторые гидрофобные группы, которые открыты для взаимодействия с гидрофобными лигандами в среде. Гидрофобное взаимодействие усиливается буферами с высокой ионной силой.

Любая подходящая колонка НИС-НPLC может быть использована для способов, раскрытых в настоящем документе, включая, без ограничения указанным, Dionex ProPac НИС-10, mAbPac НИС-10, mAbPac НИС-20, mAbPac НИС-бутил (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Саннивилл, Калифорния). Буфер может быть любым подходящим буфером. В некоторых вариантах осуществления НИС-НPLC выполняют в буфере с рН примерно от 5 примерно до 7, или примерно от 6 примерно до 7, или примерно от 6,5 примерно до 7,5. В некоторых вариантах осуществления колонки представляют собой Dionex MabPac НИС-10 (100×4,6 мм, 5 мкм, размер пор 1000Å) и ProPac НИС-10 (100×4,6 мм, 5 мкм, размер пор 300Å).

Смесь, содержащая два или более антител, анализируют на НИС-НPLC. Антитела элюируются в разное время (время хроматографирования). Антитела контролируются путем измерения их оптической плотности, например, при 280 нм в УФ-спектре. Хроматограмма может использоваться для мониторинга и документирования пробега. В некоторых вариантах осуществления буферы, используемые в НИС-НPLC, представляют собой разные градиенты 1 М сульфата аммония (от 100% до 0%) в 100 мМ фосфатном буфере.

В некоторых вариантах осуществления молекулы антител определяют количественно путем сравнения их оптической плотности при 280 нм со стандартной кривой. Стандартная кривая может быть построена путем определения оптической плотности известного антитела при известных концентрациях из серии НИС-НPLC при оптической плотности, например, 280 нм. Чем больше абсорбция (или «оптическая плотность»), тем выше концентрация белка. Эти данные для известных концентраций антитела используются для построения стандартной кривой, построения графика концентрации по оси X и абсорбции, полученной из хроматографического профиля элюирования антитела с помощью НИС-НPLC, по оси Y.

Хроматографируется образец, содержащий два или более антител неизвестных концентраций, включая антитело из стандартной кривой. Для анализа данных антитела разделяют с помощью HIC-NPLC. Профили элюирования антител отображаются на хроматограмме, с концентрацией антител, представленной абсорбцией, контролируемой во времени спектрофотометром. Абсорбция каждого антитела, определяемая по его времени элюирования (времени хроматографирования), используется для определения соответствующего значения абсорбции на стандартной кривой. Соответствующее значение оси X для этой точки на стандартной кривой представляет собой концентрацию этого антитела в образце.

В некоторых аспектах настоящего изобретения способы количественного определения отдельных антител в смеси, раскрытые в настоящем документе, могут быть полезны, если относительная гидрофобность поверхности каждого антитела в смеси отличается от гидрофобности каждого другого антитела в смеси более чем примерно на 0,25 единиц, например, примерно от 0,5 примерно до 1 единицы по шкале гидропатии Кайта и Дулиттла. Относительная гидрофобность поверхности антител может быть определена/оценена рядом способов.

Например, HIC-NPLC можно использовать для определения относительной гидрофобности поверхности различных молекул антител. Каждую из молекул антитела хроматографируют отдельно на HIC-NPLC и определяют время хроматографирования (время элюирования) для каждого антитела.

В некоторых вариантах осуществления различие в гидрофобности поверхности между антителами в смеси определяют одним или более из следующих способов: расчетная гидрофобность поверхности на основе структуры белка или структурной модели, метод быстрого скрининга на растворимость в сульфате аммония или PEG8000 и быстрый скрининг для взаимодействия молекул методом спектроскопии аффинного захвата самовзаимодействия на наночастицах (AC-SINS).

Относительная гидрофобность поверхности может быть рассчитана на основе известной структуры антитела (на основании, например, кристаллической структуры или структуры ЯМР) или

структурной модели. Такие вычислительные способы известны в данной области.

Относительную гидрофобность поверхности можно рассчитать/оценить путем определения растворимости молекул антител, например, с помощью способа быстрого скрининга на растворимость в условиях, которые повышают гидрофобность, таких как сульфат аммония или PEG8000. Чем более растворим белок, тем менее гидрофобен. (См., например, Kramer et al., *Biophysical Journal* Volume 102 April 1907-1915 (2012).)

Относительная гидрофобность поверхности может быть рассчитана/оценена путем быстрого скрининга взаимодействия молекул с помощью аффинного захвата-спектроскопии наночастиц с самовзаимодействием (AC-SINS). (См., например, Estep et al., *MAbs*, 7: 3, 553-561 (2015).) AC-SINS - это подход, при котором на золотые наночастицы наносят покрытие в виде поликлональных антител против белков человека, и используют эти конъюгаты для иммобилизации mAb человека и оценивают собственные взаимодействия mAb путем измерения длин волн плазмона конъюгатов антител в зависимости от концентрации сульфата аммония.

В некоторых других вариантах осуществления антитела в смеси, которая может быть разделена с использованием описанных способов, будут иметь такой же размер или общий заряд, как определено одним или более из следующих способов: структура белка или структурное моделирование на основе последовательности и других известных белковых структур, рассчитанное свойство общего заряда белка на основе белковых последовательностей, рассчитанная гидрофобность на основе белковых последовательностей и секвенирование белка.

В некоторых вариантах осуществления антитела в смеси имеют, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 98% или, по меньшей мере, 99% гомологичной структуры белка или структурных моделей на основе последовательности и других известных белковых структур. В определенных вариантах осуществления антитела в смеси имеют рассчитанные свойства заряда белка в пределах 3, 4 или 5, 10 или 15 элементарных единиц относительно друг друга,

где свойства заряда белка рассчитывают на основе последовательности белка. В некоторых вариантах осуществления два или более антител в смеси имеют по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности между их белковыми последовательностями.

В одном аспекте способы количественного определения антител в смеси с использованием HIC-HPLC, описанные в настоящем документе, могут быть не столь полезными, если существует большая разница между молекулами антител, рассчитанными или оцененными по структуре белка, структурным моделям на основе последовательности, последовательностям белка, и другим известным аспектам структуры белка. Если существуют различия в гидрофобных профилях антител, то способы, использующие HIC-HPLC, могут, тем не менее, способствовать разделению видов антител.

В другом аспекте способы количественного определения антител в смеси с использованием HIC-HPLC, как описано в настоящем документе, могут быть не столь полезными, если существует большая разница между молекулами антител, рассчитанными/оцененными по рассчитанному свойству общего заряда белка для каждой молекулы антитела, на основе последовательности белка каждой молекулы антитела. Если существуют различия в гидрофобных профилях антител, то способы, использующие HIC-HPLC, могут, тем не менее, способствовать разделению видов антител.

В другом аспекте способы количественного определения антител в смеси с использованием HIC-HPLC, как описано в настоящем документе, могут быть не столь полезными, если существуют большие различия между молекулами антител, рассчитанными/оцененными путем проверки заряда или размера белка. Если существуют различия в гидрофобных профилях антител, то способы, использующие HIC-HPLC, могут, тем не менее, способствовать разделению видов антител.

В определенных вариантах осуществления одно или более антител в смеси антител представляют собой моноклональные антитела. В определенных вариантах осуществления одно или более моноклональных антител представляют собой моноклональные

антитела человека. В определенных вариантах осуществления две или более молекул антител имеют один и тот же изотип. В определенных вариантах осуществления две или более молекул антител являются вариантами друг друга. В некоторых других вариантах осуществления две или более молекул антитела связываются с одним и тем же антигеном. mAb могут представлять собой молекулы цельного антитела.

В определенных вариантах осуществления смесь представляет собой комбинированную композицию. В некоторых других вариантах осуществления комбинированная композиция содержит два или более mAb, которые эффективны для лечения ближневосточного респираторного синдрома (MERS) у пациента-человека. Антитела к коронавирусу MERS (MERS-CoV) раскрыты, например, в заявке на патент США № 14/717760 и публикации международной заявки № WO2015/179535A1. В некоторых других вариантах осуществления комбинированная композиция содержит mAb, которые эффективны при лечении геморрагической лихорадки Эбола у пациента-человека. Антитела к вирусу Эбола раскрыты, например, в заявке на патент США № 15/005334, поданной 25 января 2016 г. В некоторых дополнительных вариантах осуществления комбинированная композиция содержит mAb, которые эффективны при лечении макулярной дегенерации у пациента-человека. В некоторых дополнительных вариантах осуществления комбинированная композиция содержит mAb алирокумаб и эвинакумаб, раскрытые в предварительной заявке США № 62/302907. В определенных вариантах осуществления комбинированная композиция содержит антитела против PD1 и другие продукты антител для иммуноонкологии, такие как биспецифичные антитела. (См., например, раскрытие PD-1 и CD3xCD20 в предварительной заявке США № 62/270749, заявке на патент США № 15/386443 и заявке на патент США № 15/386453; и PD-1 и Lag3 в предварительной заявке США № 62/365006 и заявке на патент США № 15/289032). В определенных вариантах осуществления комбинированная композиция включает антитела против вируса Зика. (См., например, предварительную заявку США № 62/363546). В некоторых дополнительных вариантах осуществления комбинированная композиция включает тревогрумаб и антитела к активину А. (См.,

например, патент США № 8871209). В определенных вариантах осуществления два или более антител в комбинированной композиции могут лечить инфекционное заболевание у пациента-человека. Раскрытие каждого из вышеупомянутых патентных документов в этом абзаце включено ссылкой.

MAb против MERS в комбинированном составе могут связываться, например, с белком шипа MERS-CoV (например, с белком шипа изолята MERS-CoV EMC/2012). Эпитоп белка шипа может находиться в пределах домена, связывающего рецептор белка шипа (например, аминокислоты, выбранные из аминокислот с 367 по 606 в последовательности GenBank AFS88936.1). Моноклональные антитела против MERS в комбинированной композиции могут быть: полностью человеческим моноклональным антителом, которое связывается с белком шипа MERS-CoV; антителом, которое взаимодействует с одним или более аминокислотными остатками в рецептор-связывающем домене белка шипа MERS-CoV, выбранного из аминокислотных остатков с 367 по 606 последовательности GenBank AFS88936.1; антителом, которое связывается с белком шипа MERS-CoV с константой диссоциации ( $K_D$ ) менее 18,5 нМ, согласно измерениям в анализе поверхностного плазмонного резонанса; или антителом, которое блокирует связывание белка шипа MERS-CoV с дипептидилпептидазой 4 (DPP4) более чем на 90%.

Комбинированная композиция может представлять собой любую композицию, содержащую два или более антител, направленных на одну и ту же или другую мишень, и которая эффективна при лечении одного и того же или различных заболеваний или состояний у пациента, включая пациента-человека.

#### Фармацевтические композиции и составы

Композиции, содержащие две или более молекул антитела, могут быть приготовлены в виде фармацевтической композиции (например, DP) для введения пациенту. Фармацевтические композиции могут включать, например, три молекулы антитела. Любые подходящие фармацевтические композиции и составы, а также подходящие способы приготовления и подходящие пути и подходящие участки введения входят в объем настоящего изобретения. Также, если не указано иное, предполагаются любые подходящие дозировки

и частота введения.

mAb в комбинированных составах очищают способами, известными в данной области, перед совместным введением. Комбинированные составы двух или более антител могут представлять собой любые подходящие составы.

Фармацевтические композиции/составы могут включать фармацевтически приемлемый носитель (т.е. вспомогательное вещество). «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к любым растворителям, дисперсионным средам, покрытиям, антибактериальным и противогрибковым агентам, изотоническим агентам и агентам, замедляющим абсорбцию, разбавителям, глидантам и т. п. Композиции могут включать фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения кислоты или соль присоединения основания (См., например, Berge et al. J Pharm Sci 66:1-19 (1977)). Композиция может включать сахарозу или может быть покрыта оболочкой, когда это необходимо.

В некоторых вариантах осуществления белковые композиции могут быть стабилизированы и приготовлены в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы, лиофилизированной таблетки, твердого вещества и т. п. Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения двух или более mAb в необходимых количествах в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Как правило, дисперсии готовят путем включения двух или более молекул mAb в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. Надлежащая текучесть раствора может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Длительная абсорбция инъекционных композиций может быть достигнута включением в композицию реагента, который задерживает абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

#### Примеры

Для лучшего понимания этого изобретения приведены следующие

примеры. Эти примеры представлены только в целях иллюстрации и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения.

mAb против вируса Эбола в комбинированном составе, использованном в примерах 1 и 3-7, представляют собой цельные полностью человеческие моноклональные антитела IgG1. Три mAb (mAb А, mAb В и mAb С) имеют сходные молекулярные массы (например, примерно 145 кДа), структуру белка и свойства заряда (например, различие в рI примерно 0,6 или менее, что определяется последовательностями белка). Изоэлектрическая точка (рI) mAb А определяется как 9, рI mAb В определяется как 8,5, а рI mAb С определяется как 9,1.

Моноклональные антитела против MERS в комбинированном составе, использованном в Примере 2, представляют собой цельные, полностью человеческие моноклональные антитела против Эболы. Два mAb имеют сходные молекулярные массы (например, в пределах примерно 15 кДа относительно друг друга) и свойства заряда. (См. Патентную публикацию США № US 2015/0337029, WO 2015/179535A1 и патентную заявку США № 14/717760, описание каждой из которых включено в настоящий документ ссылкой).

#### Пример 1

Способ HIC-HPLC используют для количественного определения 3 моноклональных антител против вируса Эбола (mAb 1, mAb 2 и mAb 3) с одинаковыми молекулярными массами, структурами белка и свойствами заряда из комбинированного состава путем, во-первых, разделения 3 mAb из комбинированного состава и затем путем количественного определения каждого из них.

Использовали колонку Dionex ProPac HIC-10, кат. № 063655 (Dionex, Thermo Fisher Scientific, Саннивилл, Калифорния), 4,6×100 мм.

#### Подготовка подвижных фаз

Подвижные фазы включают подвижную фазу А и подвижную фазу В. Подвижная фаза А включает 1 М фосфат аммония и 100 мМ фосфат при рН 7. Приготовление подвижной фазы А включает: растворение 13,8 г одноосновного фосфата натрия, моногидрата ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )

и 132,1 г фосфата аммония в 800 мл Milli Q; доведение pH до 7 с помощью 50% NaOH; доведение объема до 1000 мл; и фильтрование раствора через фильтр 0,22 мкм. Подвижная фаза В включает 100 мМ фосфата при pH 7. Подготовка подвижной фазы В включает: растворение 13,8 г одноосновного фосфата натрия, моногидрата ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) в 900 мл Milli Q; доведение pH до 7 с помощью 50% NaOH; доведение объема до 1000 мл; и фильтрование раствора через фильтр 0,22 мкм.

#### Способ HIC-HPLC

Осуществляли хроматографию HIC-HPLC через вышеупомянутую колонку со скоростью потока 0,5 мл/мин. Температуру колонки поддерживали равной 30 °C, а температуру образца комбинированного состава на уровне 5 °C. Время остановки колонки составляет 40 минут. Поглощение ультрафиолетового излучения 280 нм контролировали с помощью УФ-детектора. В приведенной ниже Таблице 1 показано сочетание подвижной фазы А и подвижной фазы В в процентах от градиента композиции подвижной фазы, вводимой в течение времени хроматографирования колонки.

Таблица 1: Градиент подвижной фазы

Время (мин)	% Подвижная фаза А	% Подвижная фаза В
0	60	40
4	60	40
19	0	100
32	0	100
33	60	40
40	60	40

Калибровка с тремя отдельными mAb

Чтобы откалибровать результаты для трех отдельных mAb, использовали известные количества каждого mAb в FDS. Готовили FDS с известной концентрацией каждого mAb, и концентрацию измеряли либо хроматографией с обращенной фазой (RP), либо Solo VPE® Spectroscopy (например, C Technologies, Inc.). Известные FDS для каждого mAb представлены ниже:

Таблица 2: Концентрация каждого mAb FDS, измеренная с помощью RP или Solo VPE®

Состав	Известное количество mAb (г)	Известная концентрация mAb (t=0) (мг/мл)
mAb 1 FDS	84,08	51,31 (с помощью Solo VPE®)
mAb 2 FDS	84,13	53,4 (с помощью RP)
mAb 3 FDS	84,19	50,65 (с помощью RP)

Также для калибровочной последовательности готовили контрольный образец. Контрольная последовательность имеет концентрацию 50,31 мг/мл, измеренную с помощью Solo VPE® Spectroscopy (например, C Technologies, Inc.). Одна инъекция контрольного образца составляет 12 мкл (603,72 мкг)

В приведенной ниже Таблице 2 приведены калибровочные образцы, используемые для каждого из mAb FDS.

Таблица 2: Калибровочные образцы

Количество	Количество инъекций
mAb 1 FDS: 50,5 мг/мл рабочий Стандарт Lot# YC10190-42A (Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY)	
2 мкл=101 мкг	1 инъекция
3 мкл=151,5 мкг	1 инъекция
4 мкл=201 мкг	1 инъекция
5 мкл=252,5 мкг	1 инъекция
6 мкл=303 мкг	1 инъекция
mAb 2 FDS: 51,7 мг/мл рабочий Стандарт Lot# YC10190-42B (Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY)	
2 мкл=103,4 мкг	1 инъекция
3 мкл=155,1 мкг	1 инъекция
4 мкл=206,8 мкг	1 инъекция
5 мкл=258,5 мкг	1 инъекция
6 мкл=310,2 мкг	1 инъекция
mAb 3 FDS: 51.4 мг/мл рабочий Стандарт Lot# YC10190-42C (Regeneron Pharmaceuticals, Tarrytown, NY)	
2 мкл=102,8 мкг	1 инъекция
3 мкл=154,2 мкг	1 инъекция
4 мкл=205,6 мкг	1 инъекция
5 мкл=257 мкг	1 инъекция
6 мкл=308,4 мкг	1 инъекция

Запускается последовательность калибровки. Во время последовательности калибровки одна инъекция контрольного образца вводится в начале каждого набора образцов (например, набора инъекций mAb 1 FDS, набора инъекций mAb 2 FDS или набора инъекций mAb 3 FDS) после каждые 20-24 инъекции mAb FDS и в конце каждой последовательности инъекций.

В течение одной калибровочной последовательности выполняется одна инъекция каждого известного количества mAb. Во

время другой калибровочной последовательности четыре инъекции каждого известного количества mAb выполняются для определения воспроизводимости инъекций.

Стандартная калибровочная кривая строится для каждого mAb. Калибровочная кривая для каждого mAb имеет  $R^2 \geq 0,999$ , а вариабельность повторных инъекций одних и тех же количеств каждого mAb составляет  $\leq 1\%$ .

#### Контрольные характеристики

Проводили контрольный прогон HIC-HPLC каждого известного mAb FDS. Процент извлечения для каждого известного FDS mAb рассчитывали путем измерения концентрации с помощью HIC-HPLC, а затем делили концентрацию, измеренную с помощью HIC-HPLC, на известную концентрацию mAb в таблице 2. По расчетам процент извлечения составляет 90-110% от известных концентраций для всех трех известных mAb FDS.

#### Неизвестные образцы

Примерный комбинированный состав, имеющий в общей сложности 600мкг mAb (например, 12 мкл 50 мг/мл mAb образца) пропускали через HIC-HPLC. Так, например, 12 мкл комбинированного состава, включающего в общей сложности 600мкг mAb, может включать эквивалент трех инъекций 200 мкг/инъекции индивидуального mAb. Отдельные mAb в комбинированном составе представляют собой mAb 1, mAb 2 и mAb 3.

Проводят повторный анализ образца и составляют отчет о средней концентрации (мг/мл) каждого отдельного mAb в комбинированном составе и соотношении каждого mAb к общему количеству mAb.

ФИГ. 1 представляет хроматограмму, демонстрирующую хроматографирование с помощью HIC-HPLC этого комбинированного состава. Каждое mAb изображается отдельной линией, а cFDS в целом также изображается линией. Эти 3 антитела хорошо разделены HIC-HPLC с небольшим перекрытием пиков.

#### Пример 2

Методы множественной HIC-HPLC использовали для количественного определения 2 моноклональных антител против MERS

с одинаковыми молекулярными массами и свойствами заряда из комбинированного состава, сначала путем отделения 2 mAb из комбинированного состава, а затем путем количественной оценки каждого из них.

Лекарственные вещества с mAb

Объединяли два лекарственных вещества с mAb (mAb 1 и mAb 2). Лекарственное вещество с mAb 1 включает 52,3 мг/мл mAb 1 и 10 mM His при pH 5,5 (Regeneron Pharmaceuticals, Тарритаун, Нью-Йорк). Лекарственное вещество с mAb 2 включает 40,4 мг/мл mAb 2 и 10 mM His при pH 6 и включает 5% (масс./об.) сахарозы (Regeneron Pharmaceuticals, Тарритаун, Нью-Йорк).

Способы с HIC-HPLC

Использовали семь HIC-HPLC. В каждом методе загружали 50 мкг образца (mAb 1 и mAb 2). Выходящий поток контролировали с помощью УФ-детекции при 280 нм. В подвижной фазе в различной пропорции использовали два растворителя. Растворитель А представляет собой 20 mM ацетат 1M (NH<sub>4</sub>) SO<sub>4</sub> при pH 5,5, а растворитель В представляет собой ацетат 20 mM при pH 5,5.

#### 1. Способ 1

Таблица 3.1: Способ 1 информация о градиенте и потоке

Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А в подвижной фазе	%В в подвижной фазе
Начало	0,5	100	0
4	0,5	100	0
29	0,5	0	100
40	0,5	0	100
41	0,5	100	0
50	0,5	100	0

ФИГ. 2 демонстрирует хроматограмму этого хроматографирования. Два антитела в некоторой степени разделены, но имеют значительное совпадение.

#### 2. Способ 2-0,5% в минуту

Таблица 3.2: Способ 2 информация о градиенте и потоке

Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А в подвижной фазе	%В в подвижной фазе
Начало	0,5	40	60
4	0,5	40	60
40	0,5	20	80
41	0,5	0	100
51	0,5	0	100

52	0,5	40	60
56	0,5	40	60

ФИГ. 3 демонстрирует хроматограмму этого хроматографирования. Два антитела в некоторой степени разделены, но имеют значительное совпадение.

### 3. Способ 3-0,2% в минуту

Таблица 3.3: Способ 3 информация о градиенте и потоке

Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А в подвижной фазе	%В в подвижной фазе
Начало	0,5	39	61
4	0,5	39	61
49	0,5	39	70
50	0,5	0	100
60	0,5	0	100
61	0,5	39	61
65	0,5	39	61

ФИГ. 4 демонстрирует хроматограмму этого хроматографирования. Два антитела в некоторой степени разделены, но имеют значительное совпадение.

### 4. Способ 4-2% в минуту

Таблица 3.4: Способ 4 информация о градиенте и потоке

Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А в подвижной фазе	%В в подвижной фазе
Начало	0,5	100	0
4	0,5	100	0
34	0,5	40	60
35	0,5	0	100
45	0,5	0	100
46	0,5	100	0
50	0,5	100	0

ФИГ. 5 демонстрирует хроматограмму этого хроматографирования. Два антитела в некоторой степени разделены, но все же имеют некоторое перекрытие.

### 5. Способ 5-1% в минуту

Таблица 3.5: Способ 5 информация о градиенте и потоке

Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А в подвижной фазе	%В в подвижной фазе
Начало	0,5	80	20
4	0,5	80	20
34	0,5	50	50
35	0,5	0	100
45	0,5	0	100
46	0,5	80	20
50	0,5	80	20

ФИГ. 6 демонстрирует хроматограмму этого хроматографирования. Два антитела в некоторой степени разделены, но имеют некоторое перекрытие.

6. Способ 6-1% в минуту

Таблица 3.6: Способ 6, информация о градиенте и потоке

Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А в подвижной фазе	%В в подвижной фазе
Начало	0,5	90	10
4	0,5	90	10
44	0,5	50	50
45	0,5	0	100
55	0,5	0	100
56	0,5	90	10
60	0,5	90	10

ФИГ. 7 демонстрирует хроматограмму этого хроматографирования. Два антитела в некоторой степени разделены, но имеют некоторое перекрытие.

7. Способ 7-0,5% в минуту

Таблица 3.7 Способ 7 информация о градиенте и потоке

Время (мин)	Поток (мл/мин)	%А в подвижной фазе	%В в подвижной фазе
Начало	0,5	87	130
4	0,5	87	13
74	0,5	52	48
75	0,5	0	100
85	0,5	0	100
86	0,5	87	13
90	0,5	87	13

ФИГ. 8 демонстрирует хроматограмму этого хроматографирования. Два антитела в некоторой степени разделены, но имеют некоторое перекрытие.

Пример 3

Разделение с помощью ИС комбинированного состава, содержащего 3 мАб против вируса Эбола с одинаковыми молекулярными массами, структурами белков и свойствами заряда, проводили и оценивали в системе ВЭЖХ Agilent 1100.

В способе ИС-НPLC использовали колонку Dionex ProPac ИС-10 с подвижной фазой, состоящей из двух частей (включая подвижную фазу А (100 мМ фосфат, 1 М сульфат аммония, рН 7) и подвижную фазу В (100 мМ фосфат, рН 7)) при скорости потока 0,5 мл/мин. Метод ИС проверяли с использованием пятиточечной

калибровочной кривой для каждого mAb. Точность (% извлечения) определяли путем сравнения измеренной концентрации с теоретической концентрацией каждого mAb. Для работы колонки использовали градиент от 600 до 0 мМ сульфата аммония.

ФИГ. 9 демонстрирует хроматограмму хроматографирования с помощью HIC-HPLC. Как видно из трех отдельных пиков, три антитела хорошо разделены, и их пики практически не перекрываются.

#### Воспроизводимость и точность HIC-HPLC

Повторяемость оценивали путем анализа образцов cFDS в трех экземплярах в количестве 75%, 100%, 125%, 150% от целевого количества (600 мкг/инъекцию cFDS). Относительное стандартное отклонение (RSD) воспроизводимости определили как  $\leq 0,2\%$ .

Таблица 4: Данные воспроизводимости

Количество инъекции cFDS [мкг]	Измеренная концентрация [мг/мл]					
	mAb A		mAb B		mAb C	
	Ave (n=3)	RSD	Ave (n=3)	RSD	Ave (n=3)	RSD
450	17,4	0,1%	17	0,2%	17,9	0,2%
600	17,4	0,1%	17,3	0,1%	17,8	0,2%
750	17,3	0,1%	17,4	0,2%	17,7	0,1%
900	17,1	0,1%	17,5	0,1%	17,6	0,2%

Исследование воспроизводимости повторяли в другой день, используя колонки и подвижную фазу другой серии. RSD внутрилабораторной прецизионности определили как  $\leq 1,7\%$ .

Таблица 5: Внутрилабораторная прецизионность

Количество инъекции cFDS [мкг]	Измеренная концентрация [мг/мл]					
	mAb A		mAb B		mAb C	
	Ave (n=6)	RSD	Ave (n=6)	RSD	Ave (n=6)	RSD
450	17,3	0,8%	17,2	0,9%	18,0	0,7%
600	17,4	0,1%	17,3	0,2%	18,0	1,1%
750	17,4	0,4%	17,4	0,2%	18,0	1,7%
900	17,1	0,1%	17,4	0,6%	17,8	1,6%

#### Линейность HIC-HPLC

Линейность определяли, анализируя образцы cFDS-образцов в трех экземплярах на 9 уровнях (от 75 до 1200 мкг cFDS; от 25 до

400 мкг индивидуальных mAb). График (ФИГ. 10) площади пика индивидуального mAb в зависимости от введенного количества приводит к получению линейной кривой: при 75–300 мкг,  $R^2 \geq 0,999$ ; при 25–400 мкг,  $R^2 \geq 0,98$ .

#### Диапазон НИС-НPLC

Диапазон – это интервал между самой низкой и самой высокой концентрацией, для которого способ может продемонстрировать приемлемую прецизионность ( $\leq 1,7\%$ ), точность (восстановление 93–106%) и линейность ( $R^2 \geq 0,999$ ). Определен диапазон от 300 до 900 мкг для образца cFDS (от 100 до 300 мкг для каждого отдельного mAb). ФИГ. 11 представляет собой график зависимости % извлечения mAb относительно количества индивидуальных mAb.

#### Точность НИС-НPLC для разных партий cFDS

Данные, полученные из внутрисуточной и межсуточной точности (лот № 1 cFDS) и исследования диапазона (лот № 2 cFDS), используются для оценки точности способа. ФИГ. 12 представляет собой график зависимости % извлечения mAb относительно количества отдельных mAb. % извлечения находятся в пределах 93–106% при 75%, 100%, 125%, 150% от целевого количества (600 мкг общего белка, 200 мкг каждого mAb). Определили, что точность (% извлечения) составляет 93%–106%.

Точность НИС-НPLC для различных соотношений индивидуальных mAb в cFDS

cFDS путем смешивания 1:1:1, 2:1:1, 1:2:1, 1:1:2 отдельных mAb. Каждый cFDS анализировали при 100% от целевого количества (600 мкг/инъекция, n=3). ФИГ. 13 представляет собой % извлечения mAb против каждого отдельного mAb при различных соотношениях cFDS. % извлечения в пределах 94–106% с повторяемостью  $\leq 0,3\%$ .

Таблица 6: Сводка данных для НИС-НPLC

Воспроизводимость (450–900 мкг cFDS) (n=3)	mAb A	$\leq 0,1\%$
	mAb B	$\leq 0,2\%$
	mAb C	$\leq 0,2\%$
Внутрилабораторная прецизионность (450–900 мкг cFDS) (n=6)	mAb A	$\leq 0,8\%$
	mAb B	$\leq 0,9\%$
	mAb C	$\leq 1,7\%$

Точность (% Извлечения ) (450-900 мкг сFDS)	93-106%
Линейность	$R^2 \geq 0.999$ ( график площади пика каждого mAb против инъецированного количества индивидуального mAb в сFDS в диапазоне 75-300мкг)
Стандартная кривая	$R^2 \geq 0.999$ (50 -300 мкг индивидуального стандарта mAb)
Диапазон	100-300 мкг для каждого индивидуального mAb 300-900 мкг для образца сFDS

Применение HIC-HPLC в разработке комбинированного состава

Использование HIC-HPLC для количественного определения каждого из mAb в комбинированном составе или DP может иметь множество применений при разработке комбинированного состава. Например, концентрация каждого mAb в комбинированном составе или DP может контролироваться в исследовании стабильности при хранении.

ФИГ. 14 демонстрирует диаграмму, отслеживающую стабильность хранения трех mAb в DP как функцию времени (месяцев). HIC-HPLC используется для количественного определения количества и, следовательно, концентрации каждого из трех mAb в шесть моментов времени в течение одного года. Пример набора точек данных из одной временной точки в этом исследовании включает измерение концентрации mAb А при 16,6 мг/мл, концентрации mAb В при 17,5 мг/мл и mAb С при 17,1 мг/мл. В этом случае стабильность при хранении показывает, что в течение контролируемого периода не наблюдается заметного изменения концентрации каждого из mAb ( $\leq 4\%$ ).

Способ HIC-HPLC имеет приемлемую воспроизводимость ( $\leq 0,2\%$ ), внутрилабораторную прецизионность ( $\leq 1,7\%$ ), точность (93-106% восстановления) и линейность ( $R^2 \geq 0,999$ ) в диапазоне от 100 до 300 мкг (каждое отдельное mAb) и может использоваться для определения концентрации каждого из трех mAb в сFDS и DP.

Способ HIC-HPLC может использоваться в качестве выпускающего способа для количественного определения каждого из трех mAb в комбинированных составах DS и DP. Этот способ также

может быть использован для поддержки разработки составов.

#### Пример 4

Разработали и провели оценку разделения катионообменной жидкостной хроматографией сверхвысокого давления (СЕХ-UPLC) комбинированного состава, содержащего 3 мАб против Эболы с одинаковыми молекулярными массами, структурами белков и свойствами заряда.

В способе СЕХ-UPLC использовали колонку YMC-BioPro SP-F с подвижными фазами, включающими 200 мМ буфера MES и градиент NaCl от 10 до 120 мМ, с pH 6,5. Стандартную калибровочную кривую из шести точек готовили для каждой из трех молекул мАб (мАб А, мАб В, мАб С). Линейность каждой калибровочной кривой была определена как  $R^2 \geq 0,99$ . Три молекулы мАб отделяли из комбинированного состава (т. е. смеси) с использованием СЕХ-UPLC, и получали хроматограмму UPLC. Хроматограмма демонстрирует разделение каждого мАб с некоторым перекрытием между мАб А и мАб С.

Воспроизводимость способа оценивали путем анализа трехкратных образцов комбинированного состава в трех разных количествах (150 мкг, 225 мкг и 300 мкг). Точность (% извлечения) определяли путем сравнения измеренных концентраций для каждого образца с теоретическим значением. Линейный диапазон количественного определения каждого мАб определяли как 50–100 мкг для каждого антитела, за исключением мАб А, с  $R^2 \geq 0,973$  и точностью 75%–91%.

ФИГ. 15 демонстрирует хроматограмму хроматографирования с помощью СЕХ-UPLC для разделения 3 мАб из комбинированного состава. Три антитела были разделены с небольшим перекрытием между мАб А и мАб С.

Воспроизводимость и точность СЕХ-UPLC

Воспроизводимость оценивали путем анализа образцов сFDS в трех экземплярах в пяти различных процентных содержаниях (25–100%) от целевого количества (600 мкг/инъекция сFDS). RSD воспроизводимости составляет от 3,7% до 21,4%.

Таблица 7: Данные о воспроизводимости и точности

Количество инъекции сFDS [мкг]	Измеренная концентрация [мг/мл]					
	mAb A		mAb B		mAb C	
	RSD (n=3)	% Извлечения	RSD (n=3)	% Извлечения	RSD (n=3)	% Извлечения
150 (50 на mAb)	9,5%	80%	9,7%	83%	8,9%	86%
225 (75 на mAb)	3,7%	91%	5,0%	89%	3,7%	91%
300 (100 на mAb)	21,4%*	75%	5,2%	91%	4,9%	90%

\* Эти данные были вне аналитического диапазона способа

#### Линейность СЕХ-УРЛС

Данные исследования воспроизводимости использовали для оценки диапазона и линейности способа СЕХ-УРЛС. График (ФИГ. 16) площади пика отдельных mAb в зависимости от введенного количества обычно дает линейную кривую для каждого mAb. Однако, поскольку RSD для mAb составляет более 10%, точка данных для mAb А при 100 мкг недостаточно статистически значима, чтобы сделать вывод, что для mAb А. существует линейная кривая, простирающаяся до 100 мкг.

#### Диапазон СЕХ-УРЛС

Некоторая воспроизводимость ( $RSD \leq 10\%$ ), точность ( $> 80\%$ ) и линейность ( $R^2 \geq 0,97$ ) показана для образца сFDS от 150 до 300 мкг по общему количеству антител. Однако диапазон для СЕХ-УРЛС не так четко показан, как для НИС-НРЛС.

Таблица 8: сводка данных НИС-НРЛС

Воспроизводимость (n=3)	mAb A	$\leq 0.1\%$
	mAb B	$\leq 0.2\%$
	mAb C	$\leq 0.2\%$
Точность (% Извлечения )	mAb A	80-91%
	mAb B	83-91%
	mAb C	86-91%
Линейность	$R^2 \geq 0.97$ (график площади пика каждого mAb против инъекцированного количества индивидуального mAb в сFDS в диапазоне 50-100 мкг)	

Стандартная криваяе	R2 ≥ 0.99 (25-250 мкг стандарта индивидуального mAb)	
Диапазон	mAb A	50-75 мкг
	mAb B	50-100 мкг
	mAb C	50-100 мкг

Способ СЕХ-UPLC позволяет разделить три mAb на основе их свойств заряда с некоторым перекрытием. Перекрытие означает, что необходима ручная интеграция способа. Прецизионность, точность и диапазон СЕХ-UPLC не так оптимальны, как НИС-HPLC.

#### Пример 5

Проводили оценку SE-UPLC комбинированного состава, содержащего три mAb против Эболы с одинаковой молекулярной массой. SE-UPLC разделяет mAb по размеру. Использовали систему Waters Acquity H UPLC. Две колонки Waters BEH200 SEC соединяли последовательно. Подвижная фаза включает 10 mM фосфатный буфер при pH 6 и 1 M перхлорат. На ФИГ. 17 изображена хроматограмма SE-UPLC. Показано, что время элюции трех mAb существенно перекрывается. Таким образом, SE-UPLC является неоптимальным способом для разделения трех mAb против MERS с одинаковой молекулярной массой.

#### Пример 6

Проводили оценку iCIEF комбинированного состава, содержащего три mAb против вируса Эбола с одинаковой молекулярной массой, структурами белка и свойствами заряда. iCIEF разделяет белки по их изоэлектрической точке (pI). Использовали анализатор вариантов заряда ProteinSimple iCE3. 4% pH 3-10 Pharmalyte® использовали в качестве амфолита, а 2M мочевины использовали в качестве буфера. На ФИГ. 18 изображен профиль iCIEF, сгенерированный с использованием этих спецификаций. Показано, что существует значительное совпадение времени элюции mAb A и mAb C. Таким образом, iCIEF является неоптимальным способом разделения трех mAb против MERS.

#### Пример 7

RP-UPLC комбинированного состава, содержащего три mAb против Эболы с одинаковыми молекулярными массами, структурами белка и свойствами заряда. RP-UPLC разделяет mAb по

гидрофобности. Использовали систему UPLC Acquity UPLC. Использовали колонку ZORBAX 300SB-C8, и хроматографировали через колонку при 80 °С. Подвижная фаза содержит 60-90% ацетонитрила в 0,1% TFA. На ФИГ. 19 изображена хроматограмма RP-UPLC. Показано, что существует значительное совпадение времени элюции mAb А и mAb В. Таким образом, RP-UPLC является неоптимальным способом разделения трех mAb против MERS с одинаковой молекулярной массой.

#### Варианты осуществления

Вышеприведенное описание раскрывает только примерные варианты осуществления изобретения.

Следует понимать, что хотя изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, вышеприведенное описание предназначено для иллюстрации, а не для ограничения объема изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения. Таким образом, хотя были проиллюстрированы и описаны только определенные признаки изобретения, специалистам в данной области техники будет понятно множество модификаций и изменений. Таким образом, следует понимать, что прилагаемая формула изобретения предназначена для охвата всех таких модификаций и изменений, которые соответствуют истинному характеру изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ количественного определения первого антитела и второго антитела в смеси, где способ включает:

разделение первого антитела от второго антитела с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC); и;

определение количества первого антитела;

определение количества второго антитела;

где каждое из первого антитела и второго антитела:

элюируется во время хроматографирования, отличное от времени других антител в смеси, при хроматографировании с помощью HIC-HPLC по отдельности; и

связывается с вирусным белком.

2. Способ по п. 1, где вирусный белок представляет собой гликопротеин.

3. Способ по п. 1, где вирусный белок представляет собой спайковый белок.

4. Способ по п. 3, где спайковый белок представляет собой спайковый белок бетакоронавируса.

5. Способ по п. 1, где при хроматографировании с помощью HIC-HPLC первое антитело элюируется в первое время хроматографирования, второе антитело элюируется во второе время хроматографирования, и первое и второе время хроматографирования не перекрываются.

6. Способ по п. 1, где первое антитело и второе антитело представляют собой моноклональные антитела человека.

7. Способ по п. 1, первое антитело и второе антитело имеют белковые последовательности, которые по меньшей мере на 90% гомологичны; или

первое антитело и второе антитело имеют белковые структуры, которые по меньшей мере на 90% гомологичны, что определяется их белковыми последовательностями.

8. Способ по п. 1, где смесь представляет собой комбинированный лекарственный продукт.

9. Способ по п. 1, где каждое из первого и второго антитела связывается с вирусным белком с константой диссоциации,

составляющей менее чем 18,5 нМ согласно измерениям в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

10. Способ количественного определения антител в комбинированном лекарственном продукте, содержащем множество антител, где способ включает:

получение стандартной кривой для каждого антитела множества антител;

разделения каждого антитела множества антител с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC), где каждое антитело множества антител связывается с вирусным гликопротеином с константой диссоциации, составляющей по меньшей мере  $1 \times 10^{-12}$  М согласно измерениям в анализе поверхностного плазмонного резонанса; и

после разделения каждого антитела определение количества каждого антитела с использованием стандартной кривой.

11. Способ по п. 10, где каждое антитело множества антител связывается с вирусным гликопротеином с константой диссоциации, составляющей менее чем 18,5 нМ согласно измерениям в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

12. Способ по п. 10, где каждое антитело диссоциирует от вирусного гликопротеина со скоростью по меньшей мере  $0,0001 \text{ с}^{-1}$ , согласно измерениям в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

13. Способ по п. 10, где каждое антитело множества антител связывается с вирусным гликопротеином с диссоциативным периодом полужизни, составляющим от примерно 1,5 минут до примерно 250 минут согласно измерениям в анализе поверхностного плазмонного резонанса при температуре  $37^\circ\text{C}$ .

14. Способ по п. 10, где каждое антитело элюируется во время хроматографирования, отличное от времени других антител множества антител, при хроматографировании с помощью HIC-HPLC по отдельности.

15. Способ по п. 10, где множество антител содержит три моноклонального антитела человека.

16. Способ по п. 10, где вирусный белок представляет собой

гликопротеин, экспрессированный на поверхности инфекционной вирусной частицы.

17. Способ по п. 10, где каждое антитело множества антител имеет массу в пределах 15 кДа относительно массы любых других антител множества антител.

18. Способ количественного определения антител в смеси, содержащей множество антител, где способ включает:

получение стандартной кривой для каждого антитела множества антител;

разделения каждого антитела множества антител с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с хроматографией гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC);

получение хроматограммы из HIC-HPLC, где для каждого антитела множества антител хроматограмма демонстрирует пик, который не перекрывается с другими пиками в хроматограмме; и

определение количества каждого антитела множества антител;

где каждое антитело элюируется во время хроматографирования, отличное от времени других антител множества антител, при хроматографировании с помощью HIC-HPLC по отдельности; и

где каждое антитело множества антител связывается с тем же антигеном.

19. Способ по п. 18, где антиген представляет собой вирусный белок.

20. Способ по п. 19, где вирусный белок представляет собой спайковый белок бетакоронавируса.

21. Способ по п. 18, где первое антитело множества антител связывается с первым эпитопом антигена; и второго антитела множества антител связывается со вторым эпитопом антигена.

22. Способ по п. 21, где первое антитело и второе антитело представляют собой моноклональные антитела человека;

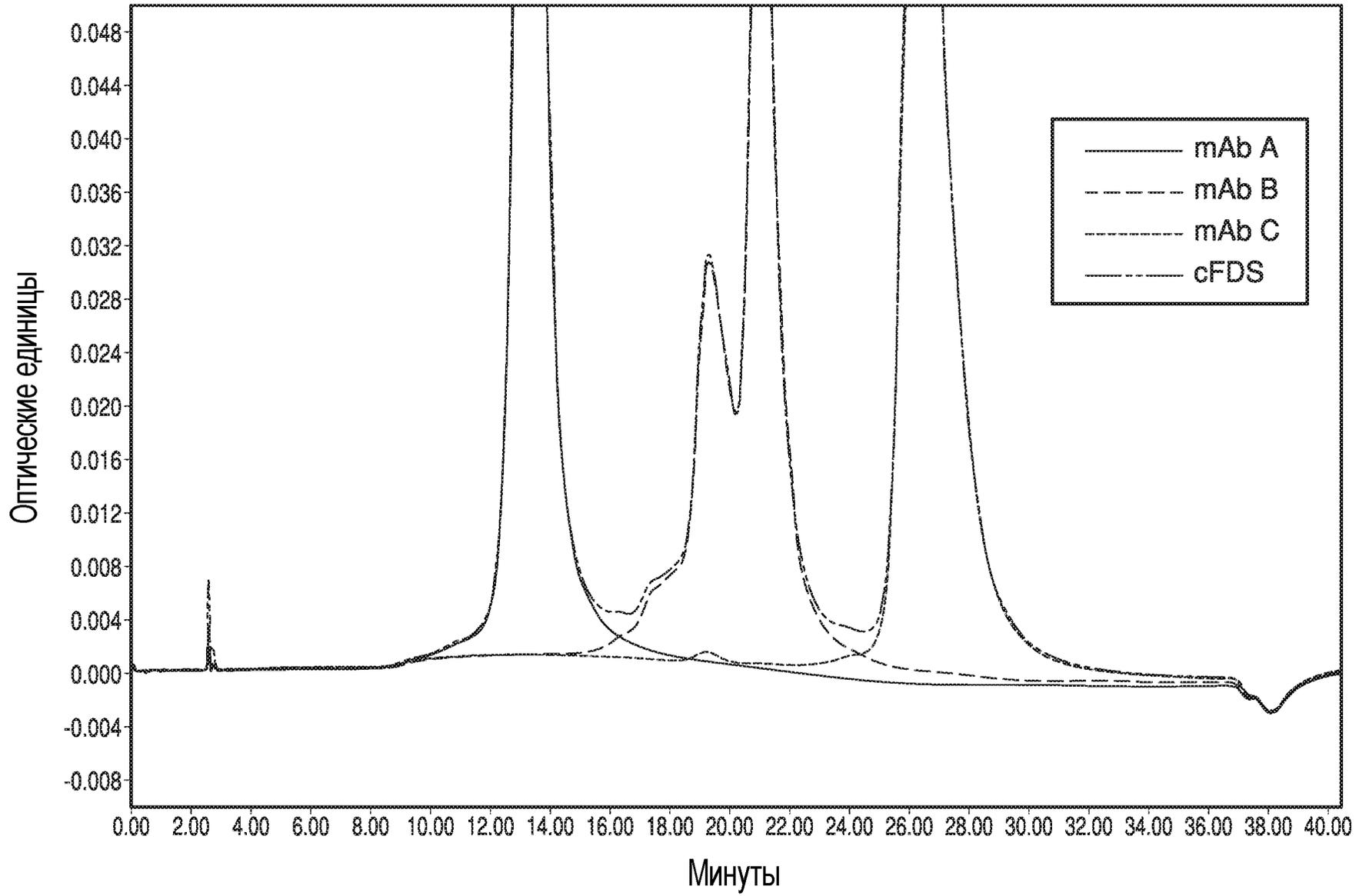
первое антитело имеет первую массу, второе антитело имеет вторую массу, и первая масса отличается от второй массы на менее чем 15 кДа; и

первое антитело и второе антитело имеют белковые последовательности, которые по меньшей мере на 90% гомологичны.

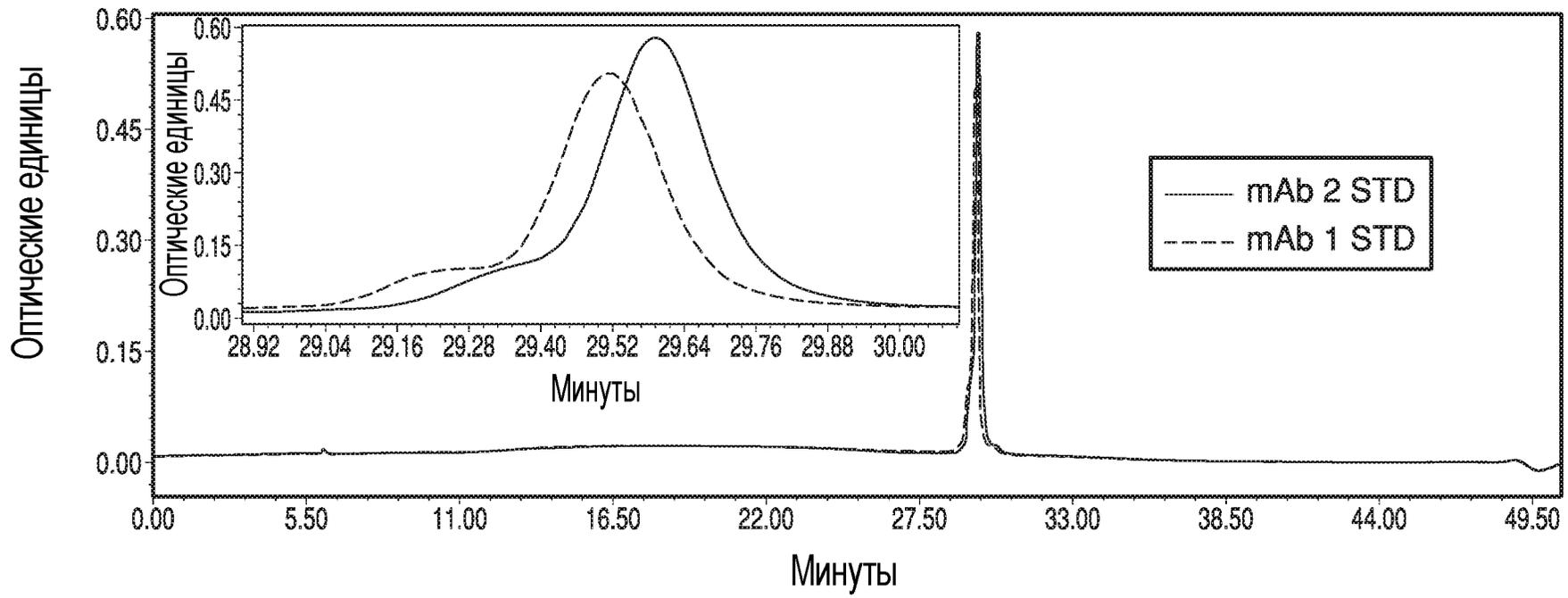
23. Способ по п. 18, дополнительно включающий до получение хроматограммы определение гидрофобности поверхности каждого антитела множества антител, где гидрофобность поверхности каждого антитела множества антител определяют с помощью одного или более способов, выбранных из группы, состоящей из: расчетной гидрофобности поверхности на основе структуры белка или структурной модели, быстрого скрининга на растворимость в сульфате аммония или PEG8000 или быстрого скрининга на взаимодействие молекул с помощью спектроскопии аффинного захвата самовзаимодействия на наночастицах (AC-SINS).

По доверенности

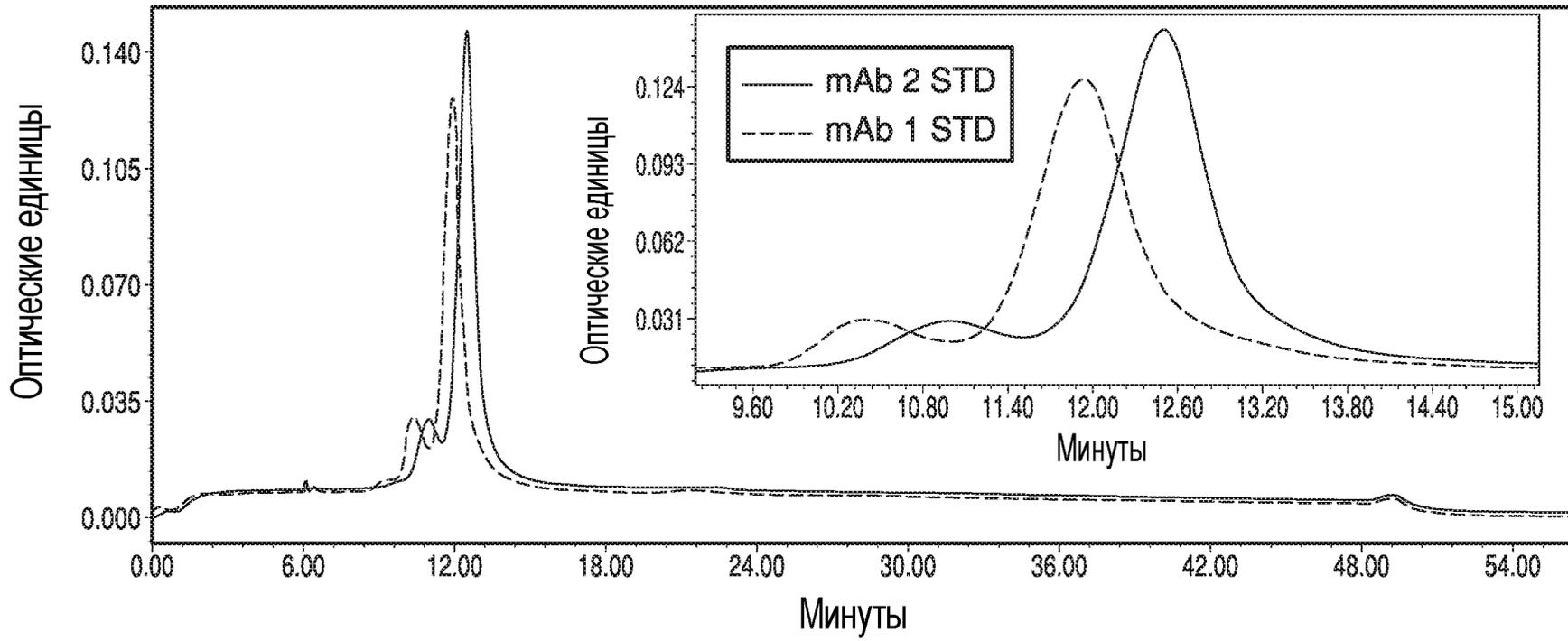
ФИГ. 1



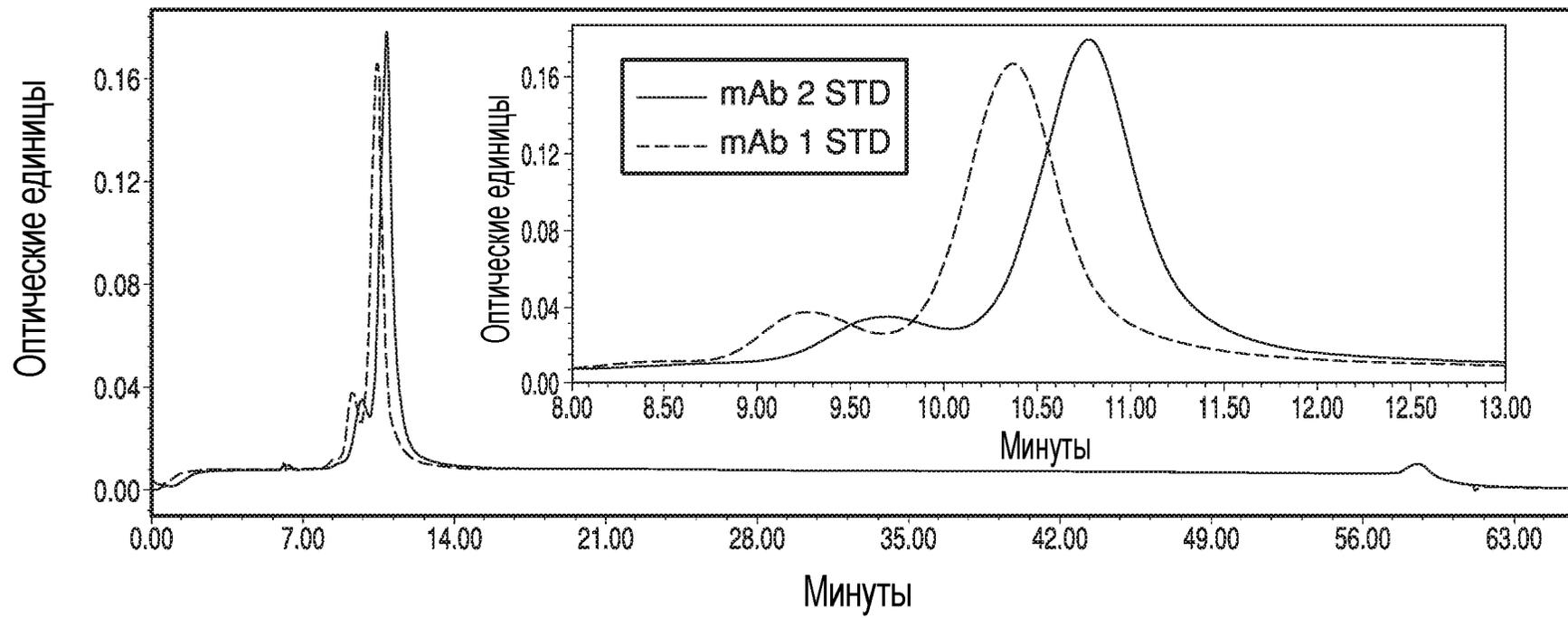
ФИГ. 2



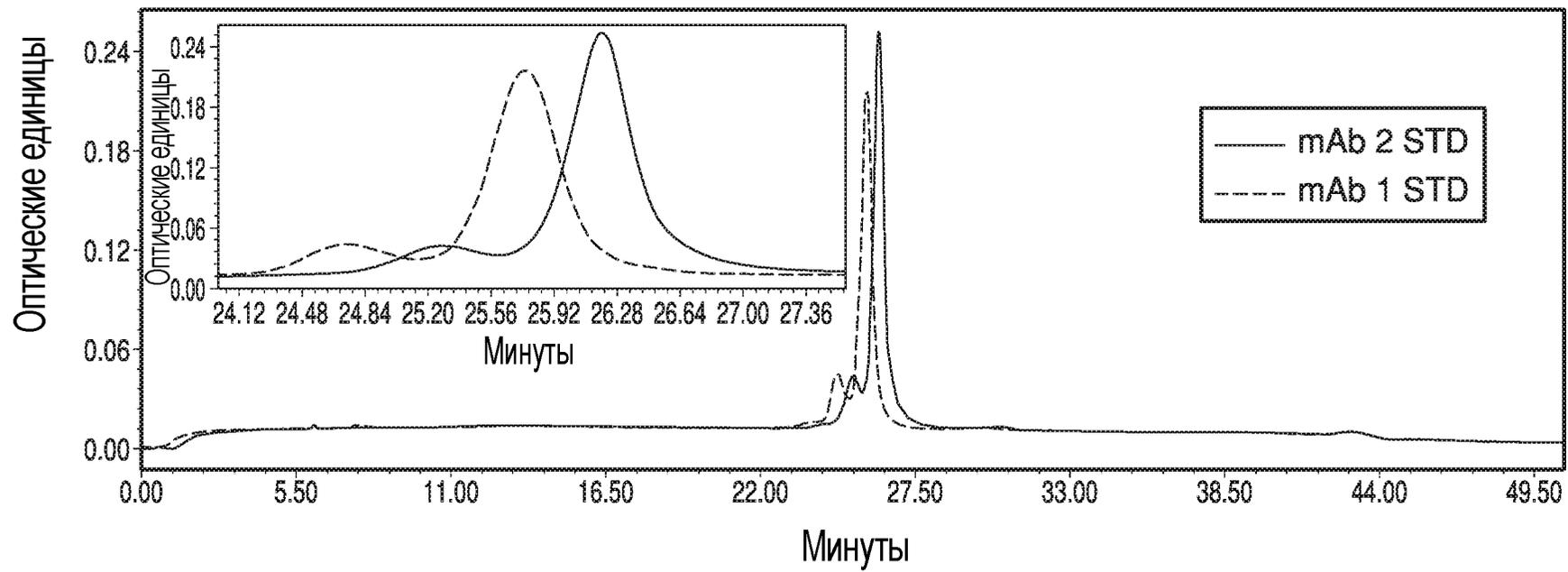
ФИГ. 3



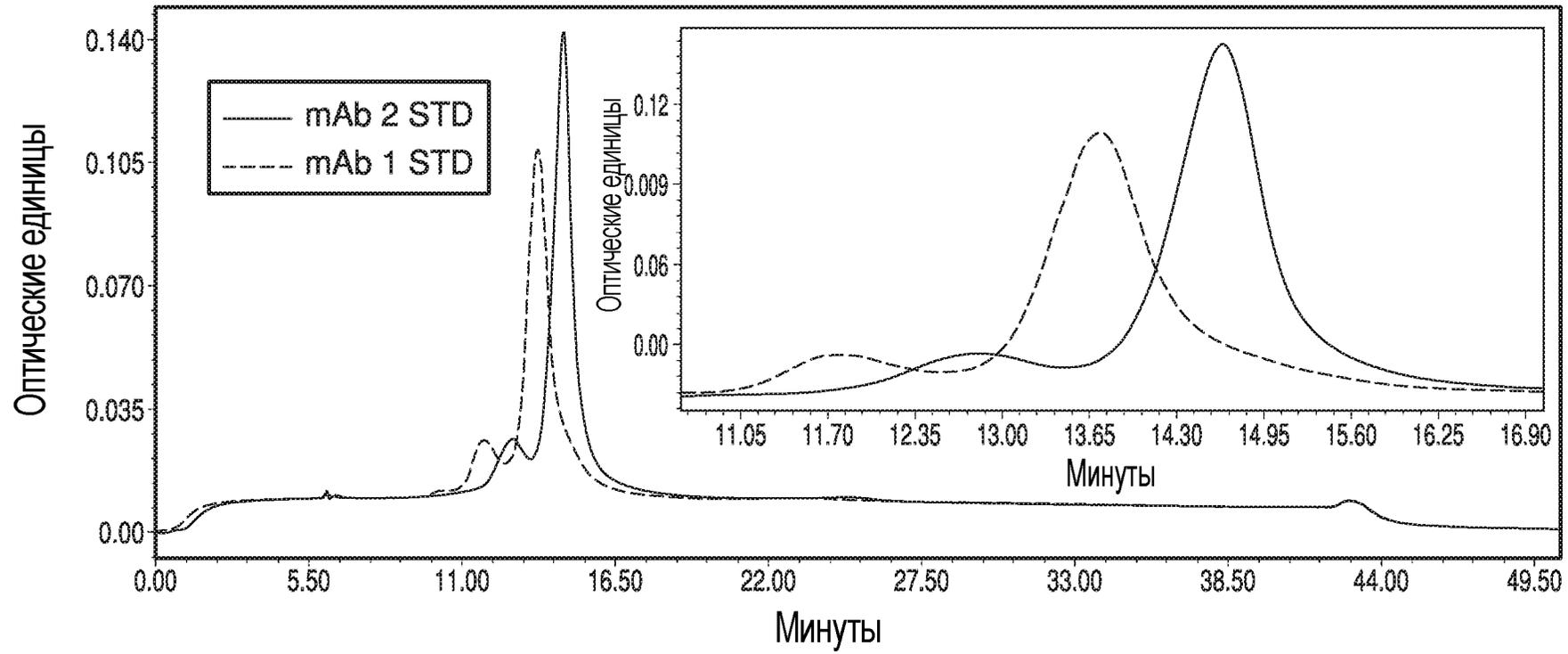
ФИГ. 4



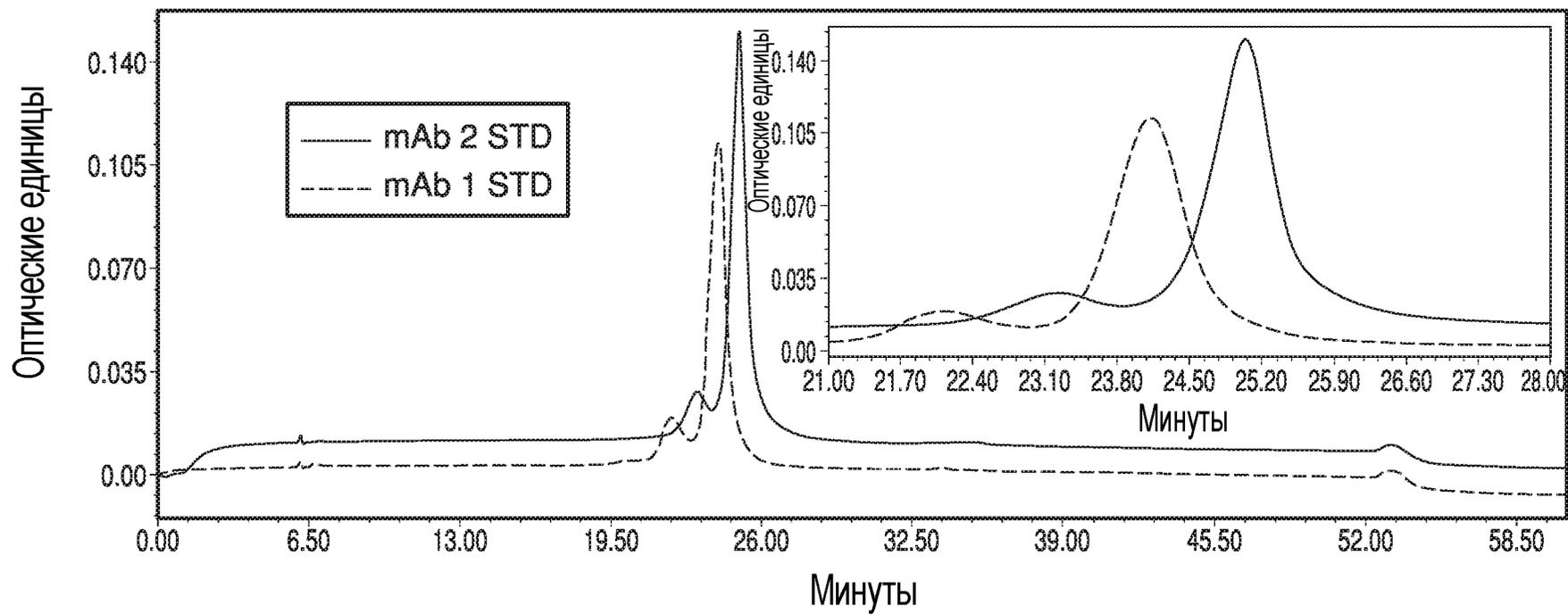
ФИГ. 5



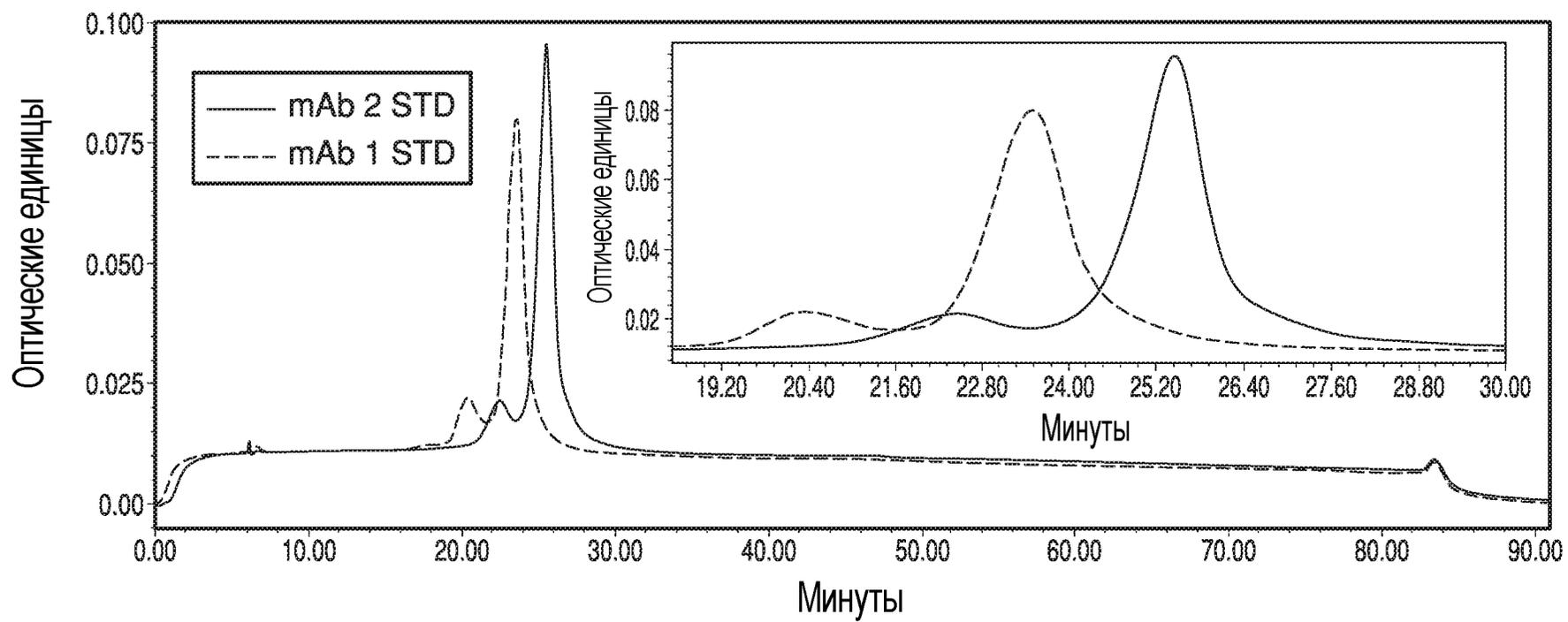
ФИГ. 6



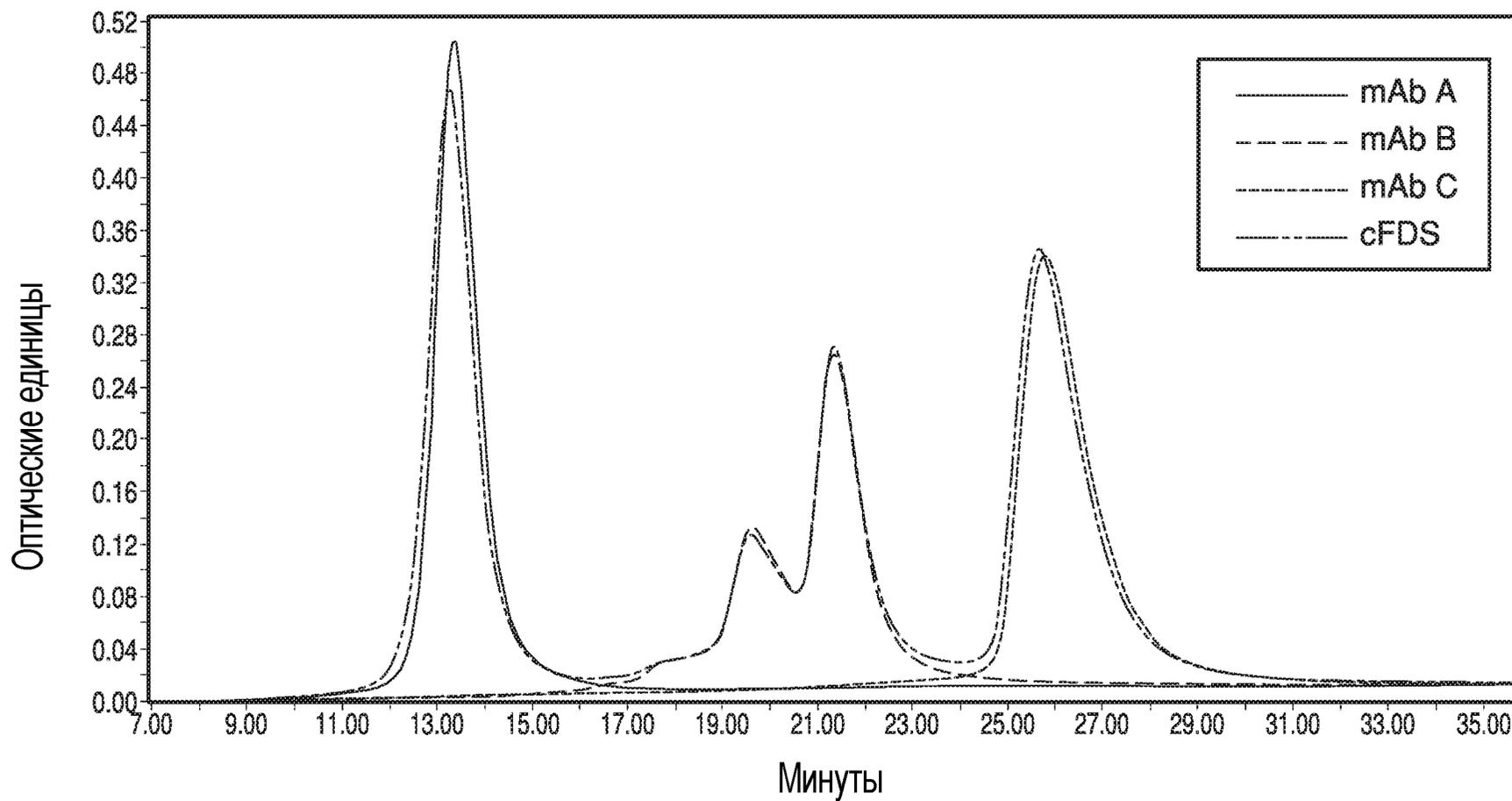
ФИГ.7



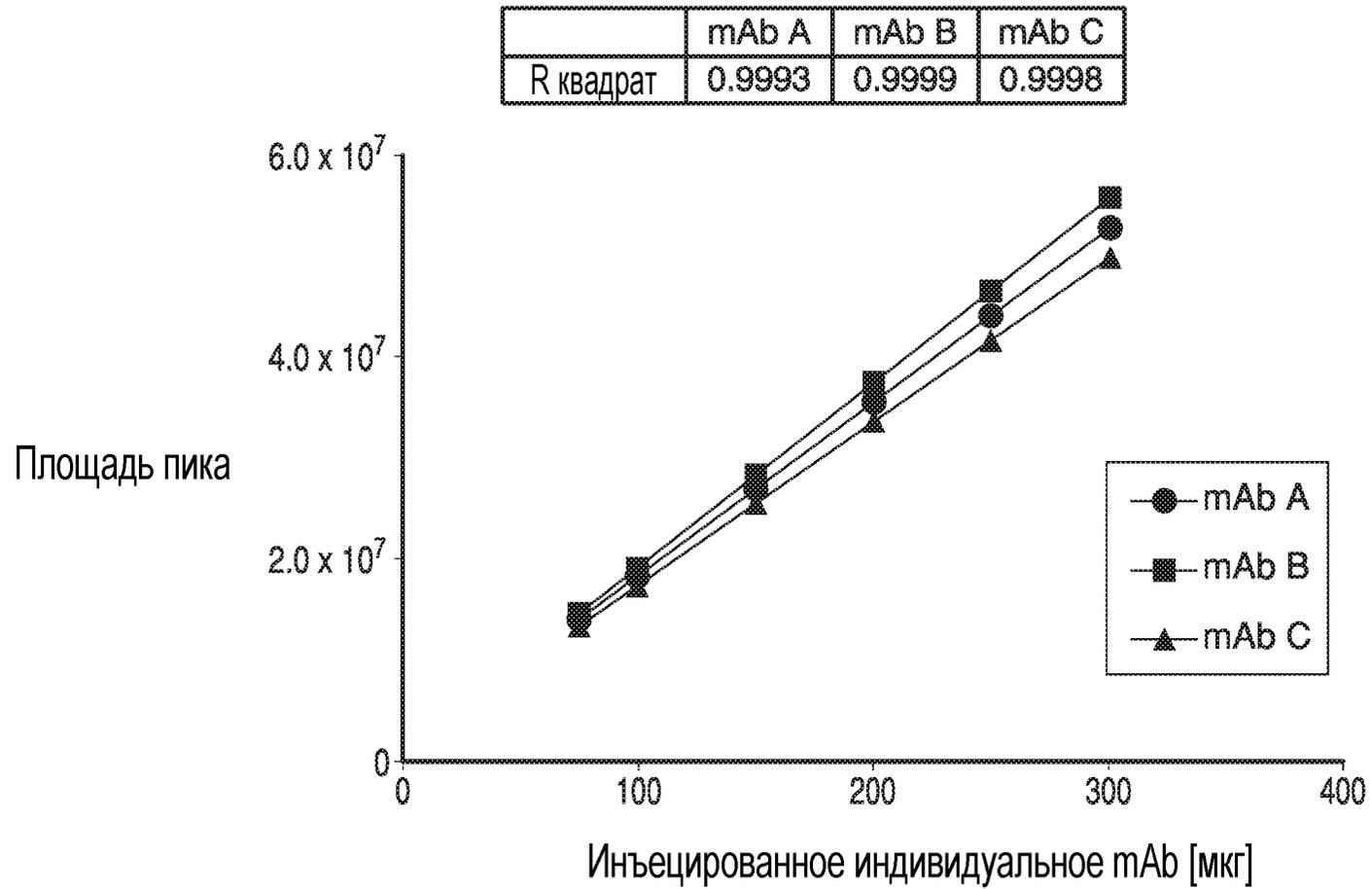
ФИГ. 8



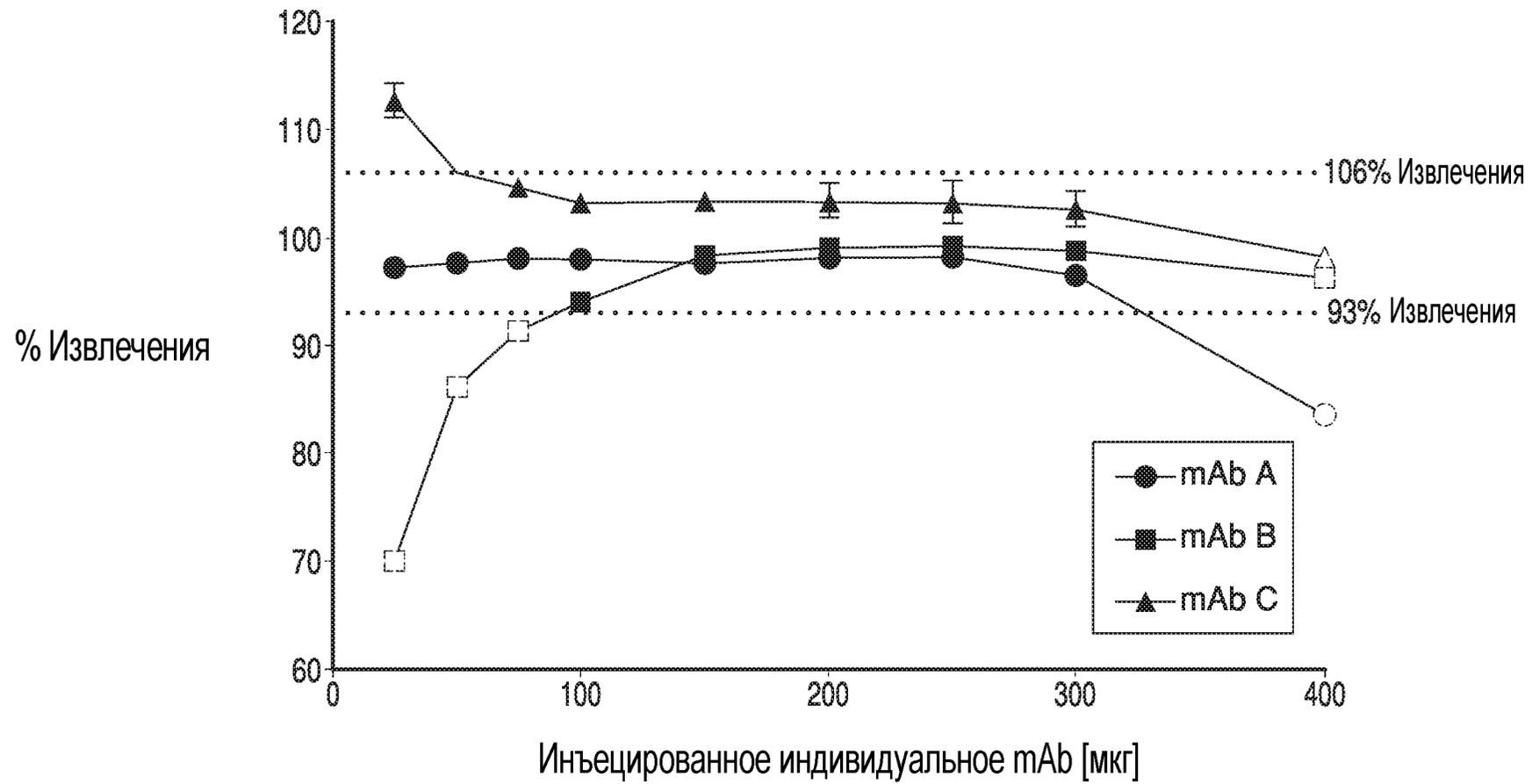
ФИГ. 9



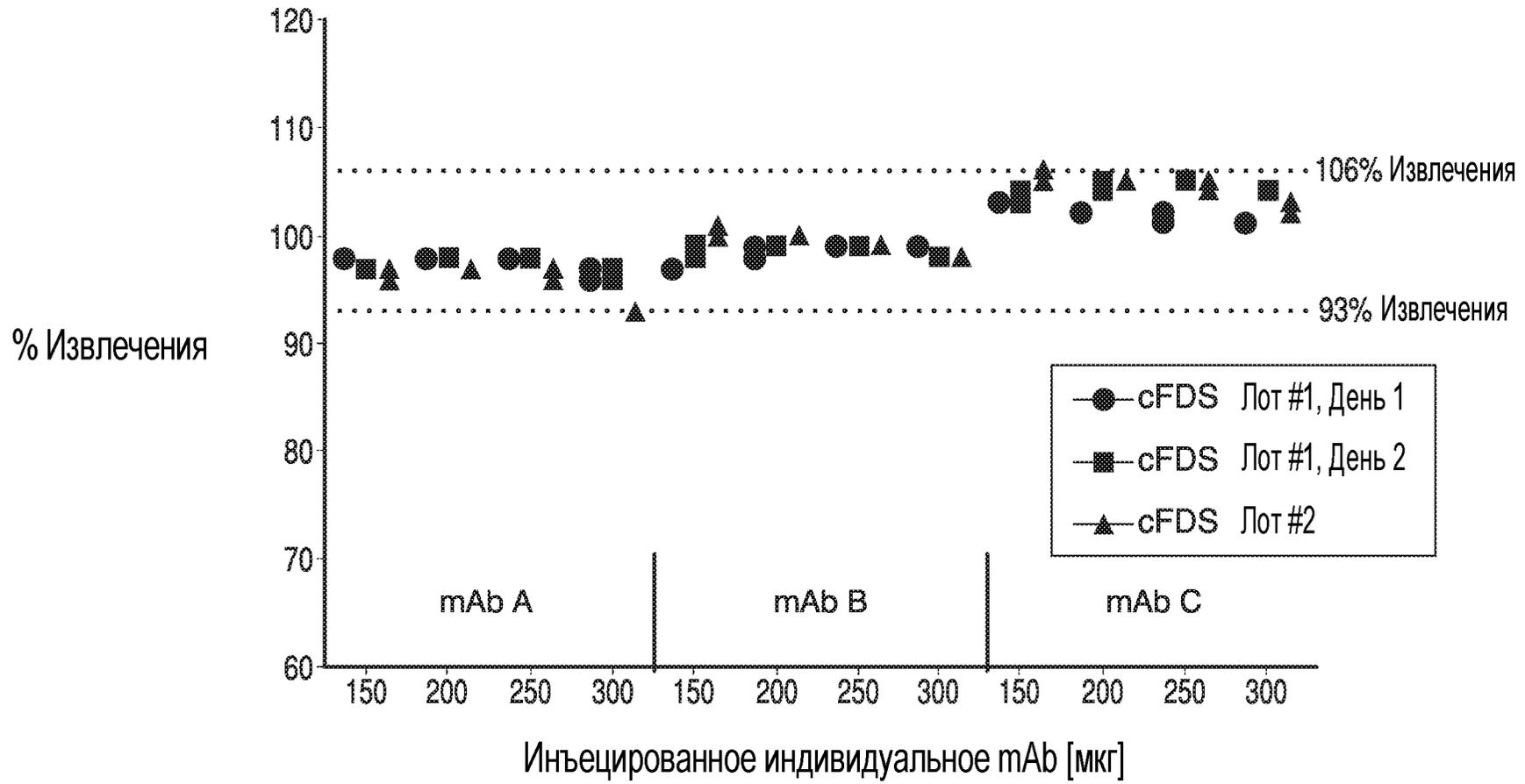
ФИГ. 10



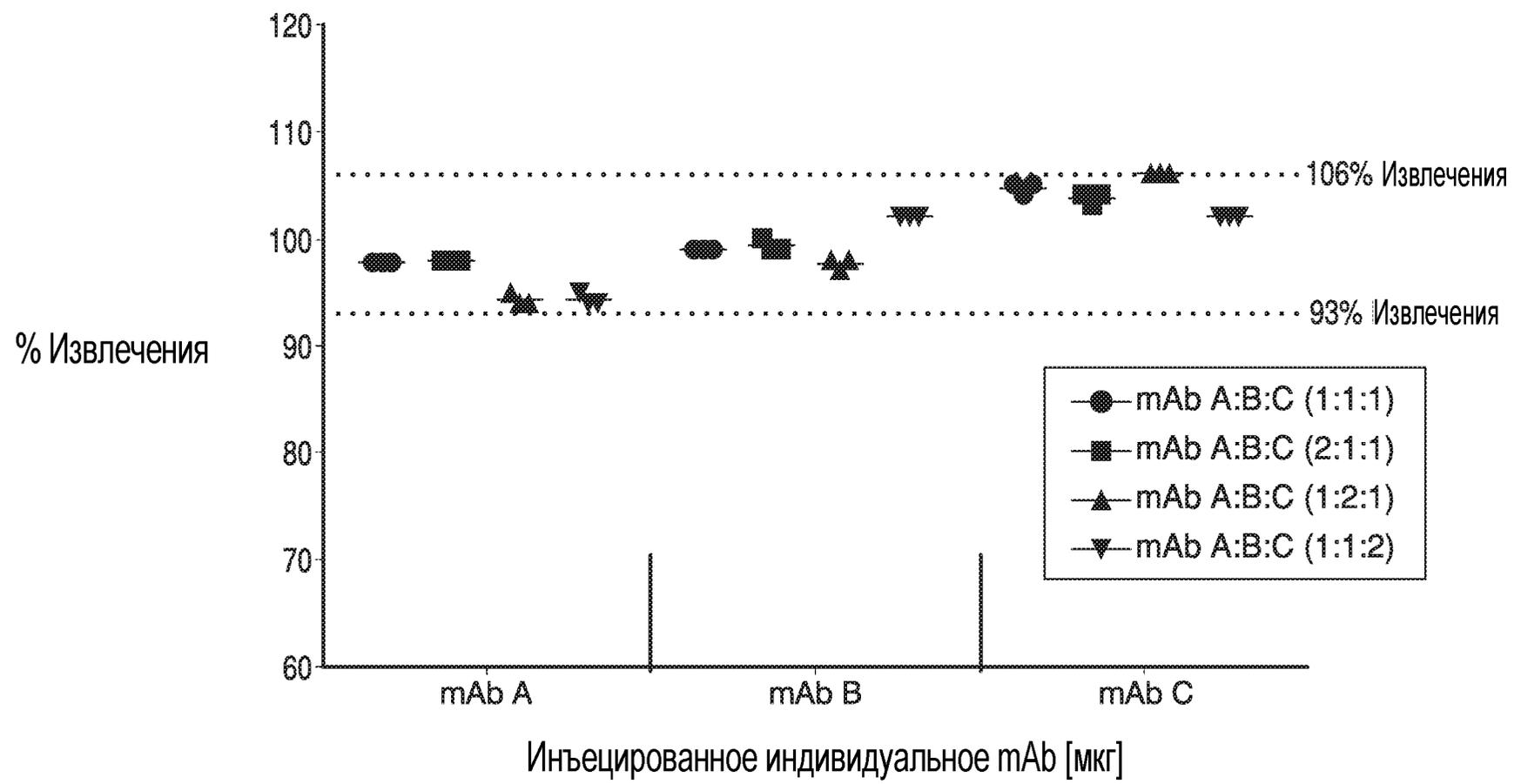
ФИГ. 11



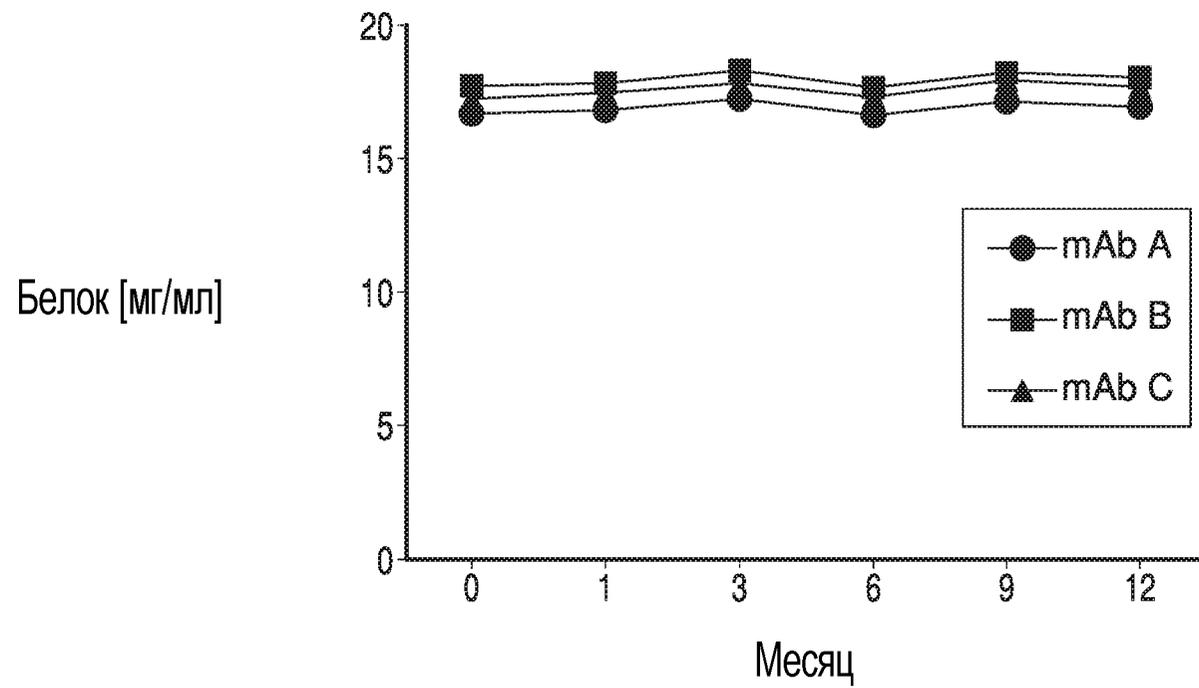
ФИГ. 12



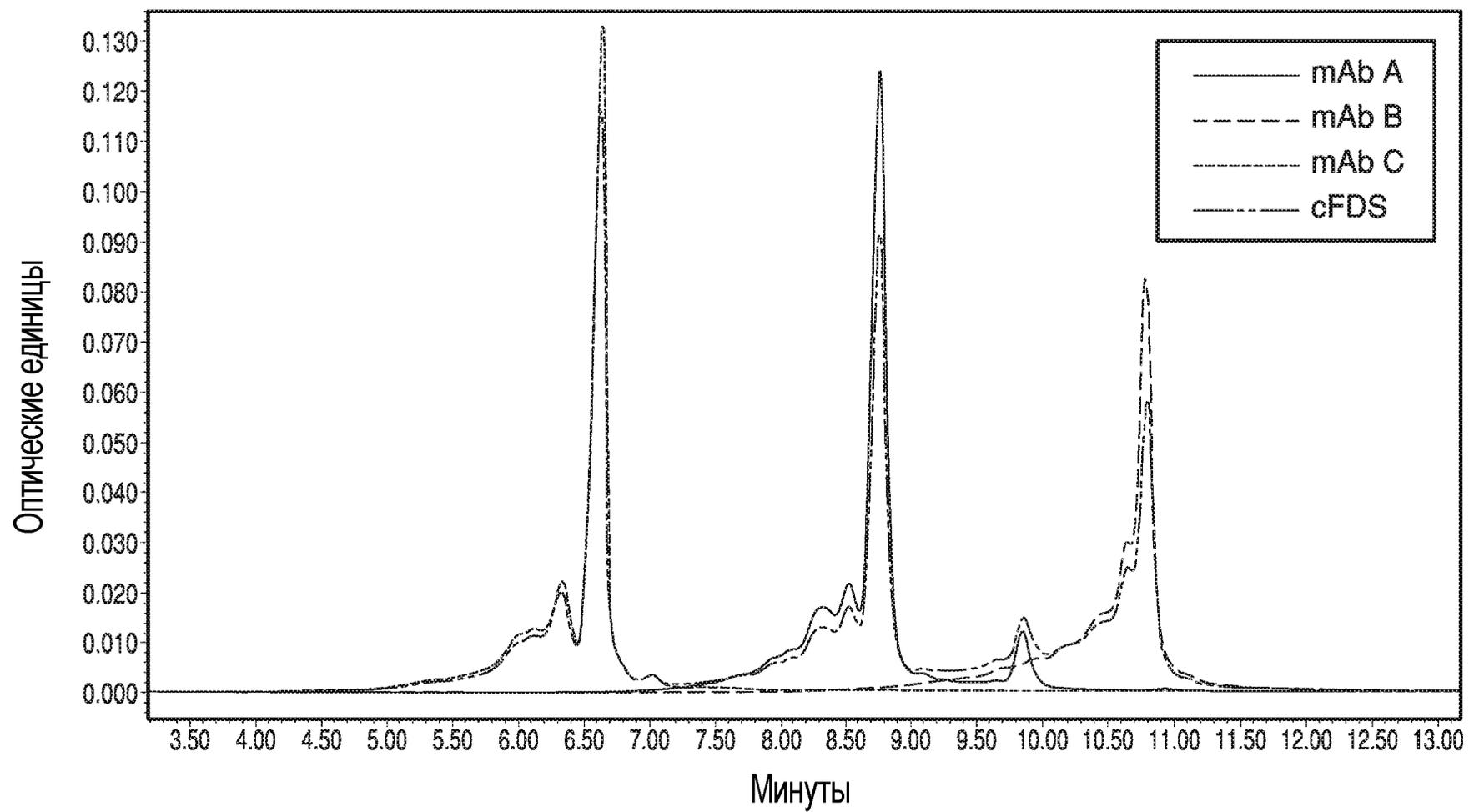
ФИГ. 13



ФИГ. 14



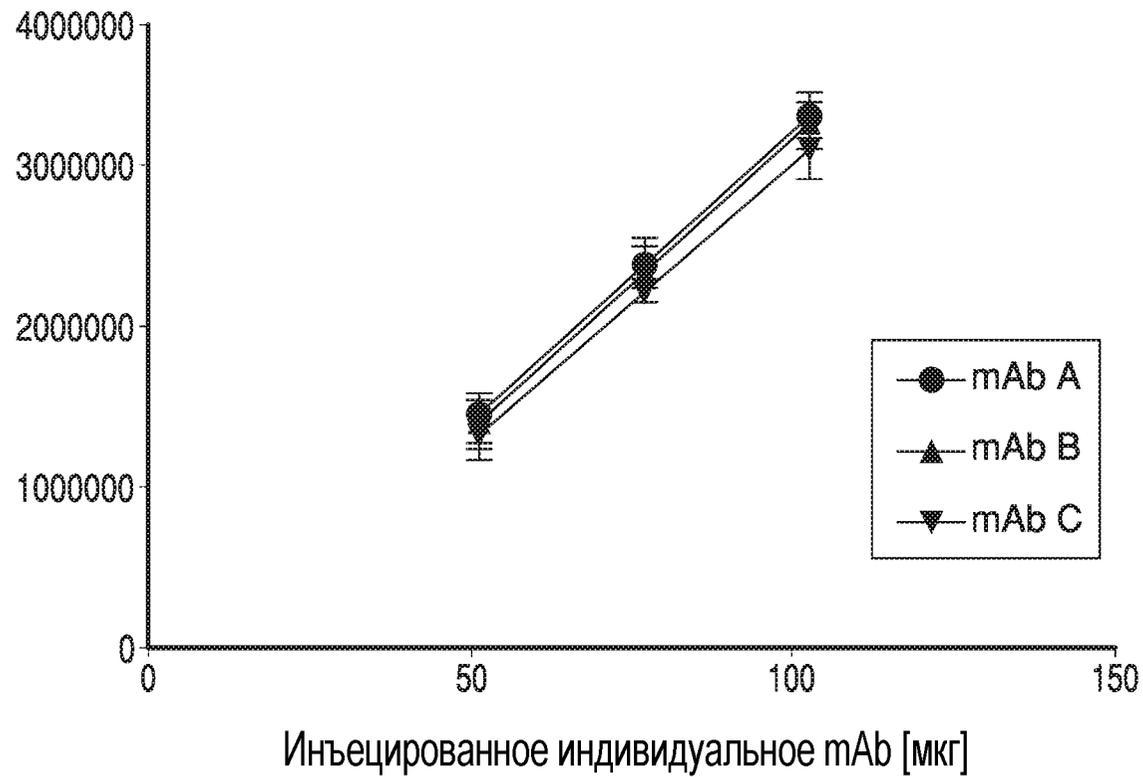
ФИГ. 15



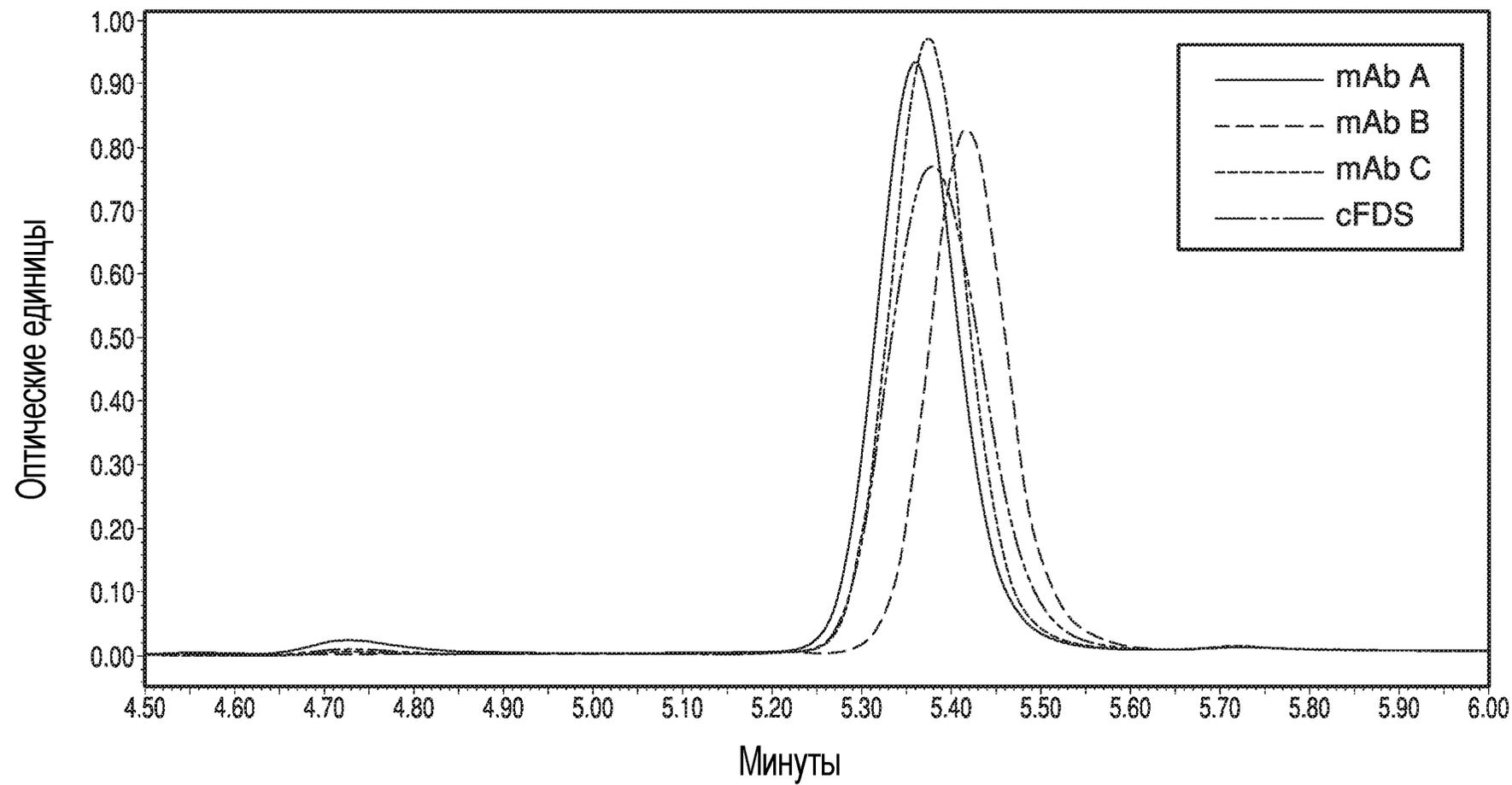
ФИГ. 16

	mAb A	mAb B	mAb C
R квадрат	0.9779	0.9733	0.9750

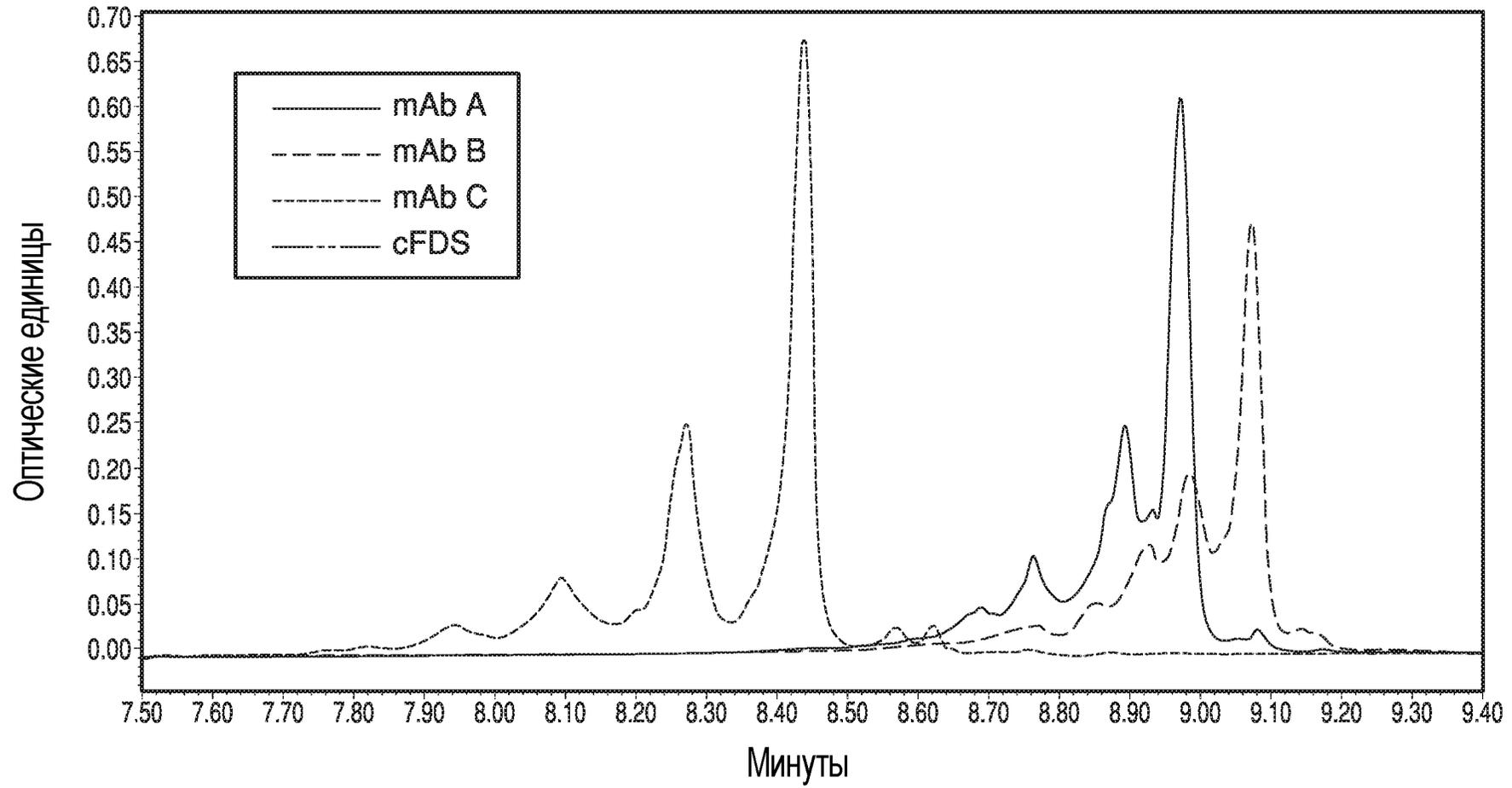
Площадь пика



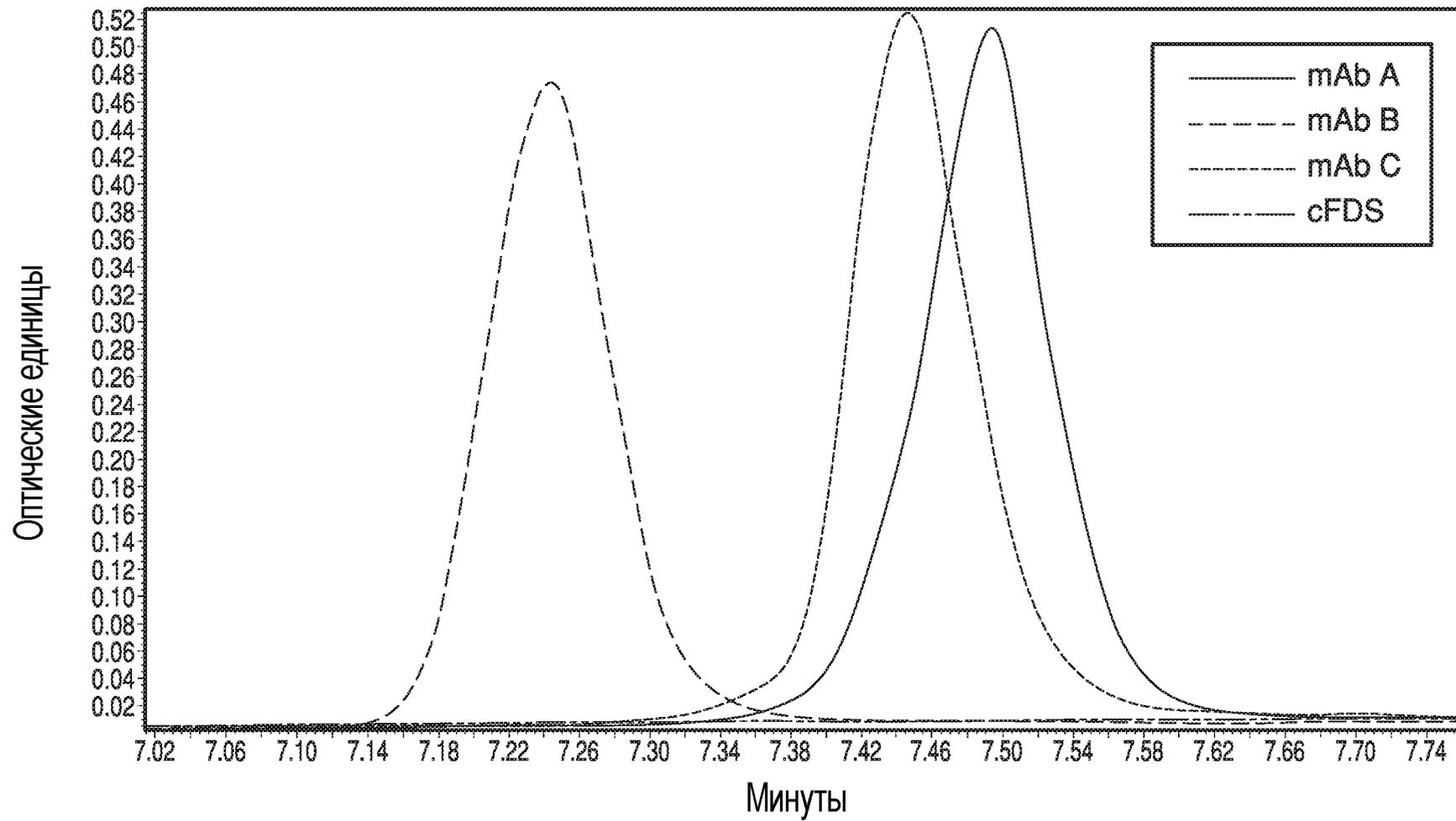
ФИГ. 17



ФИГ. 18



ФИГ. 19



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202292786****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

A61K 39/395 (2006.01)  
 A61K 38/14 (2006.01)  
 B01D 15/32 (2006.01)  
 B01D 15/42 (2006.01)  
 G01N 13/00 (2017.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

A61K 39/00, 39/215, 39/395, 38/14, B01D 15/00, 15/30, 15/32, 15/42, G01N 13/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
 Espacenet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
X	HAVERICK Mark et al. Separation of mAbs molecular variants by analytical hydrophobic interaction chromatography HPLC: overview and applications. mAbs, Taylor & Francis, 2014, Т. 6(4), p. 852-858., страницы 856-857, раздел "HIC-HPLC Method Development and Method Critical Parameters"	1-23
X	OUYANG Jun. Drug-to-antibody ratio (DAR) and drug load distribution by hydrophobic interaction chromatography and reversed phase high-performance liquid chromatography. Antibody-Drug Conjugates, Methods in Molecular Biology, vol. 1045, p. 275-283, DOI 10.1007/978-1-62703-541-5_17, реферат	1-23
X	DEBAENE Francois 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. Analytical chemistry, 2014, 86(21), p. 10674-10683, реферат, страница 3, раздел "Hydrophobic Interaction Chromatography"	1-23
X	AZEVEDO A. M. et al. Integrated process for the purification of antibodies combining aqueous two-phase extraction, hydrophobic interaction chromatography and size-exclusion chromatography. Journal of Chromatography A, 2008, 1213(2), p. 154-161, реферат, страница 155, параграф 2.5 Hydrophobic interaction chromatography, страница 156, параграф 2.6.3 Protein quantification, страницы 157-158 параграф 3.2	1-23
A	WO 2015/038888 A1 (GENENTECH, INC et al.) 19.03.2015 примеры, формула	1-23
A	EA 201201132 A1 (ДСМ АЙПИ АССЕТС Б.В.) 29.03.2013, реферат, формула	1-23
A	WO 2014/145208 A1 (BIOGEN IDEC MA INC.) 18.09.2014, страница 4, строка 29-страница 9, строка 23, примеры, формула	1-23

 последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

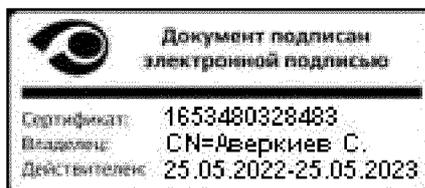
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 27 марта 2023 (27.03.2023)

Уполномоченное лицо:  
 Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев