

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390212** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.03.31

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

(22) Дата подачи заявки
2019.10.30

(54) **СПОСОБ И СИСТЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА**

(31) **62/753,633; 62/863,617**

(32) **2018.10.31; 2019.06.19**

(33) **US**

(62) **202191168; 2019.10.30**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

Янь Юэтянь, Ванг Шунхай (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлены способы и система для идентификации и/или количественного определения белка.

A1

202390212

202390212

A1

СПОСОБ И СИСТЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[1] Данное изобретение большей частью относится к способу и системе идентификации и/или количественного определения белка.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] Биофармацевтические препараты на белковой основе должны соответствовать очень высоким стандартам чистоты. В биофармацевтических препаратах содержится несколько технологических примесей и родственных примесей. Эти примеси не имеют свойств, сопоставимых со свойствами желаемого продукта в отношении активности, эффективности и безопасности. Одним из примеров являются посттрансляционные модификации (РТМ - англ.: post-translational modification) белка, которые сильно влияют на свойства белка, относящиеся к их терапевтическому применению. Другой такой пример включает гомодимерные контаминанты, которые могут присутствовать во время продуцирования биспецифических антител, которые в идеальном варианте должны быть удалены последующей очисткой. Эти примеси могут проявлять другой механизм действия и потенциальную токсичность или иммуногенность по сравнению с продуктом. Кроме того, они могут иметь более низкую стабильность, чем продукт, что представляет более высокий риск агрегации и иммуногенности. Несмотря на недавние достижения, проблема разработки способов анализа чистоты для количественной оценки таких примесей остается актуальной. Кроме того, ключевой проблемой при разработке аналитических способов для биспецифических антител может быть то, что способ должен точно и воспроизводимо обнаруживать примеси, присутствующие на уровне 2% или ниже по сравнению с основными желаемыми видами. Поэтому важно отслеживать и характеризовать такие примеси на разных этапах разработки и изготовления лекарственных средств. Несмотря на важность примесей для биологической функции, их крупномасштабное изучение затруднено из-за отсутствия подходящих способов.

[3] Аналитические способы анализа чистоты должны демонстрировать достаточную точность и разрешение для обнаружения и количественного определения желаемого продукта и его примесей. Оценка примесей, таких как РТМ в антителах и гомодимеров в биспецифических антителах, может быть затруднена из-за сходства между структурными и физико-химическими свойствами таких примесей и желаемого продукта. Прямой анализ таких примесей требует выделения желаемого продукта в достаточно большом количестве для анализа, что нежелательно и возможно только в отдельных случаях.

[4] Таким образом, в данной области техники давно ощущается потребность в способе и/или системе для идентификации и количественного определения белка, примесей и/или желаемого продукта в биофармацевтических препаратах на основе белка.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[5] Темпы разработки, масштабы изготовления и рост продаж биофармацевтических продуктов на белковой основе привел к увеличению спроса на способ и/или систему для идентификации и количественного определения примесей в продуктах.

[6] Описанные в данном документе варианты осуществления настоящего изобретения удовлетворяют вышеупомянутым требованиям, предлагая способы и системы для быстрой характеристики белков.

[7] Настоящее изобретение по меньшей мере частично обеспечивает способ количественного определения примеси в образце.

[8] В одном типовом варианте осуществления способ может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, включающего примеси, и количественное определение количества примеси в элюенте с помощью масс-спектрометра.

[9] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси в образце может включать приведение указанного образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с функцией гидрофобного взаимодействия.

[10] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси в образце может включать приведение указанного образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с функцией взаимодействия «заряд-заряд».

[11] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси в образце может включать приведение в контакт от около 10 мкг до около 100 мкг образца с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью.

[12] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, включающего примесь.

[13] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, совместимой с масс-спектрометром.

[14] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, при этом

подвижная фаза может быть выбрана из ацетата аммония, бикарбоната аммония или формиата аммония, или их комбинаций.

[15] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, содержащей общую концентрацию соли до 600 мМ.

[16] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы со скоростью потока от 0,2 мл/мин до 0,4 мл/мин.

[17] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть родственной примесью.

[18] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть технологической примесью.

[19] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом, с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть продуктом разложения белка.

[20] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть продуктом расщепления белка.

[21] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть гомодимерными видами продукта мультиспецифического антитела.

[22] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть посттрансляционной модификацией белка.

[23] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси может включать количественное определение количества примеси в указанном элюенте с помощью масс-спектрометра, при этом масс-спектрометр может быть тандемным масс-спектрометром.

[24] В одном аспекте этого варианта осуществления способ количественного определения примеси может включать количественное определение количества примеси в указанном элюенте с помощью масс-спектрометра, при этом масс-спектрометр может быть нативным масс-спектрометром.

[25] Настоящее изобретение по меньшей мере частично обеспечивает способ обнаружения примеси в образце.

[26] В одном типовом варианте осуществления способ может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, включающего примеси, и количественное определение количества примеси в элюенте с помощью масс-спектрометра.

[27] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси в образце может включать приведение указанного образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с функцией гидрофобного взаимодействия.

[28] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси в образце может включать приведение указанного образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с функцией взаимодействия «заряд-заряд».

[29] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси в образце может включать приведение в контакт от около 10 мкг до около 100 мкг образца с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью.

[30] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, включающего примесь.

[31] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, совместимой с масс-спектрометром.

[32] В некоторых конкретных типовых вариантах осуществления способ обнаружения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, при этом

подвижная фаза может быть выбрана из ацетата аммония, бикарбоната аммония или формиата аммония, или их комбинации.

[33] В некоторых конкретных типовых вариантах осуществления способ обнаружения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, содержащей общую концентрацию соли до 600 мМ.

[34] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы со скоростью потока от 0,2 мл/мин до 0,4 мл/мин.

[35] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть примесью, связанной с лекарственным продуктом.

[36] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть технологической примесью.

[37] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом, с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть продуктом разложения белка.

[38] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом, с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть продуктом расщепления белка.

[39] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть гомодимерными видами продукта мультиспецифического антитела.

[40] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом примесь может быть посттрансляционной модификацией белка.

[41] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси может включать обнаружения количества примеси в элюенте с помощью масс-спектрометра, при этом масс-спектрометр может быть tandemным масс-спектрометром.

[42] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения примеси может включать обнаружения количества примеси в указанном элюенте с помощью масс-спектрометра, при этом масс-спектрометр может быть нативным масс-спектрометром.

[43] Настоящее изобретение по меньшей мере частично обеспечивает способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка в образце.

[44] В одном типовом варианте осуществления способ может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, включая целевой белок, и обнаружение и/или количественное определение количества целевого белка в элюенте с помощью масс-спектрометра.

[45] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка в образце может включать приведение указанного образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с функцией гидрофобного взаимодействия.

[46] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка в образце может включать приведение указанного образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с функцией взаимодействия «заряд-заряд».

[47] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка в образце может включать приведение в контакт от около 10 мкг до около 100 мкг образца с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью.

[48] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, включающего примесь.

[49] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, совместимой с масс-спектрометром. В конкретном аспекте способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, при этом подвижная фаза может быть выбрана из ацетата аммония, бикарбоната аммония или формиата аммония, или их комбинации. В другом конкретном аспекте способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка в

образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, содержащей общую концентрацию соли до 600 мМ.

[50] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка в образце может включать промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы со скоростью потока от 0,2 мл/мин до 0,4 мл/мин.

[51] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом целевой белок может быть антителом.

[52] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом целевой белок может быть биспецифическим антителом.

[53] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом целевой белок может быть терапевтическим белком.

[54] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом целевой белок может быть примесью.

[55] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом целевой белок может быть технологической примесью биофармацевтического процесса изготовления белка.

[56] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом целевой белок может быть родственной примесью биофармацевтического процесса изготовления белка.

[57] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или

количественного определения целевого белка может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом целевой белок может быть продуктом разложения белка.

[58] В одном аспекте этого варианта осуществления, способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом целевой белок может быть продуктом расщепления белка.

[59] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать приведение образца в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом целевой белок может быть гомодимерными видами продукта мультиспецифического антитела.

[60] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать количественное определение количества целевого белка в указанном элюенте с помощью масс-спектрометра, при этом масс-спектрометр может быть тандемным масс-спектрометром.

[61] В одном аспекте этого варианта осуществления способ обнаружения и/или количественного определения целевого белка может включать количественное определение количества целевого белка в указанном элюенте с помощью масс-спектрометра, при этом масс-спектрометр может быть нативным масс-спектрометром.

[62] В одном типовом варианте своего осуществления настоящее изобретение, по меньшей мере частично, обеспечивает хроматографическую систему со смешанным режимом хроматографической колонкой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью и масс-спектрометр.

[63] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с функцией гидрофобного взаимодействия.

[64] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с функцией взаимодействия «заряд-заряд».

[65] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, которую можно применять для элюирования от около 10 мкг до около 100 мкг образца.

[66] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать смолу для эксклюзионной хроматографии со

смешанным режимом, способную принимать подвижную фазу.

[67] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом, дополнительно способную принимать образец, содержащий целевой белок.

[68] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом, которую можно промывать подвижной фазой.

[69] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать масс-спектрометр, соединенный с хроматографической колонкой, имеющей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью.

[70] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать тандемный масс-спектрометр.

[71] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать нативный масс-спектрометр.

[72] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать хроматографическую колонку, имеющую смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом смола для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом может быть совместима с подвижной фазой, выбранной из ацетата аммония, бикарбоната аммония или формиата аммония или их комбинации.

[73] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать хроматографическую колонку, имеющую смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом можно промывать с применением подвижной фазы, содержащей до 600 мМ общей концентрации соли.

[74] В одном аспекте этого варианта осуществления хроматографическая система со смешанным режимом может содержать хроматографическую колонку, имеющую смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, при этом хроматографическую колонку можно промывать подвижной фазой со скоростью потока от 0,2 мл/мин до 0,4 мл/мин.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[75] Фиг. 1 демонстрирует пример системы, применяемой для количественного определения и/или обнаружения белка с помощью эксклюзионной хроматографии или ионообменной хроматографии.

[76] Фиг. 2 демонстрирует подход к очистке биспецифического антитела от гомодимерных видов посредством типового варианта осуществления.

[77] Фиг. 3 демонстрирует серию Хофмайстера, показывающую влияние анионов и

катионов на осаждение белка (или содействие гидрофобному взаимодействию).

[78] Фиг. 4 демонстрирует систему эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом и масс-спектрометрии согласно типовому варианту осуществления.

[79] Фиг. 5 демонстрирует графики времени удерживания восьми mAb в смеси образцов на колонке VEN200 SEC, полученные при концентрациях подвижной фазы в диапазоне от 30 mM до 300 mM, при этом две вставки представляют хроматограммы базовых пиков (BPC - англ.: base peak chromatograms) из анализа MM-SEC-MS восьми mAb в соответствующих концентрациях согласно типовому варианту осуществления.

[80] Фиг. 6 демонстрирует хроматографический профиль образца биспецифического антитела, полученный с помощью типовой системы эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом и масс-спектрометрии с применением подвижных фаз: общая концентрация соли 150 mM и общая концентрация соли 450 mM.

[81] Фиг. 7 демонстрирует экстракционную ионную хроматограмму (XIC - англ.: extracted ion chromatogram) и нативные масс-спектры биспецифического антитела, гомодимера 1 и гомодимера 2, разделенных и проанализированных с помощью системы эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом и масс-спектрометрии согласно типовому варианту осуществления.

[82] Фиг. 8 демонстрирует сравнение общей ионной хроматограммы (TIC - англ.: total ion chromatogram) и спектров нативной MS для RP LC-MS на Lumos, SEC-MS на EMR и MM-SEC-MS на EMR антитело-детектируемой спектрометрии, согласно типовому варианту осуществления.

[83] Фиг. 9 демонстрирует экстракционные ионные хроматограммы (XIC) и нативные масс-спектры последовательных циклов MM-SEC-MS обнаружения антитела с помощью Zenix SEC-300, 3 мкм, 300 Å, 7,8 × 300 мм согласно типовому варианту осуществления.

[84] Фиг. 10 демонстрирует экстракционные ионные хроматограммы (XIC), полученные при выполнении детекции гомодимерных видов в продукте биспецифического антитела согласно типовому варианту осуществления.

[85] Фиг. 11 демонстрирует сравнение экстракционных ионных хроматограмм (XIC), полученных выполнении детекции гомодимерных видов в продукте биспецифических антител с помощью Zenix SEC-300, 3 мкм, 300 Å, 7,8 × 300 мм при скорости потока 0,4 мл/мин и Zenix SEC-300, 3 мкм, 300 Å, 4,6 × 300 мм при скорости потока 0,3 мл/мин согласно типовому варианту осуществления.

[86] Фиг. 12 демонстрирует экстракционные ионные хроматограммы (XIC), полученные при выполнении анализа MM-SEC-MS дегликозилированной смеси биспецифического антитела, гомодимера 1 и гомодимера 2 с применением подвижной фазы с различной концентрацией соли согласно типовому варианту осуществления.

[87] Фиг. 13 демонстрирует график зависимости времени удерживания (в минутах) белка от общей концентрации соли в подвижной фазе для дегликозилированной смеси биспецифического антитела, гомодимера 1 и гомодимера 2 при выполнении анализа MM-

SEC-MS согласно типовому варианту осуществления.

[88] Фиг. 14 представляет собой график, демонстрирующий тенденцию времени удерживания на основе изменения общей концентрации соли при выполнении анализа MM-SEC-MS согласно типовому варианту осуществления.

[89] Фиг. 15 представляет собой график, демонстрирующий тенденцию изменения времени удерживания при изменении общей концентрации соли при выполнении анализа MM-SEC-MS согласно типовому варианту осуществления.

[90] Фиг. 16 демонстрирует экстракционные ионные хроматограммы (XIC), полученные при выполнении анализа MM-SEC-MS дегликозилированной смеси биспецифического антитела, гомодимера 1 и гомодимера 2 на колонке Waters BEH SEC согласно типовому варианту осуществления.

[91] Фиг. 17 демонстрирует график зависимости времени удерживания (в минутах) белка от общей концентрации соли в подвижной фазе для дегликозилированной смеси биспецифического антитела, гомодимера 1 и гомодимера 2 при выполнении анализа MM-SEC-MS на колонке Waters BEH SEC согласно типовому варианту осуществления.

[92] Фиг. 18 демонстрирует экстракционные ионные хроматограммы (XIC), полученные при выполнении анализа MM-SEC-MS антитела и его окисленного варианта на колонке Waters BEH SEC согласно типовому варианту осуществления.

[93] Фиг. 19 демонстрирует график зависимости времени удерживания (в минутах) белка от общей концентрации соли в подвижной фазе для антитела и его окисленного варианта при выполнении анализа MM-SEC-MS на колонке Waters BEH SEC согласно типовому варианту осуществления.

[94] Фиг. 20 демонстрирует способ приготовления образца смеси, содержащей биспецифическое антитело и его гомодимерные виды, согласно типовому варианту осуществления.

[95] Фиг. 21 демонстрирует анализ MM-SEC-MS смеси на интактном уровне биспецифического антитела и его гомодимерных видов с применением подвижной фазы с концентрацией соли 300 мМ согласно типовому варианту осуществления.

[96] Фиг. 22 демонстрирует анализ MM-SEC-MS смеси на субъединичном уровне биспецифического антитела и его гомодимерных видов с применением подвижной фазы с концентрацией соли 70 мМ согласно типовому варианту осуществления.

[97] Фиг. 23 демонстрирует результаты количественного определения гомодимеров из анализа MM-SEC-MS на интактном уровне биспецифического антитела и его гомодимерных видов согласно типовому варианту осуществления.

[98] Фиг. 24 демонстрирует результаты количественного определения гомодимеров из анализа MM-SEC-MS на субъединичном уровне биспецифического антитела и его гомодимерных видов согласно типовому варианту осуществления.

[99] Фиг. 25 демонстрирует анализ смесей биспецифических антител [четырёх различных смесей bsAb/ H2L2 гомодимер/ H*2L2 гомодимер] с помощью MM-SEC-MS либо на колонке BEH (слева), либо на колонке Zenix (справа), проведенный согласно

типовым вариантам осуществления, где каждая кривая ВРС представляет собой отдельный анализ с применением указанной концентрации соли подвижной фазы.

[100] Фиг. 26 демонстрирует исследование предела обнаружения с помощью MM-SEC-MS для гомодимерных примесей в bsAb2 (левая панель) и bsAb4 (правая панель) с применением добавленных стандартов 0,01% и 0,1% соответственно для анализа, проведенного согласно типовым вариантам осуществления, где нативные спектры МС (а, b, с, d, е и f) усреднены по соответствующим областям ТИС, и показаны два наиболее распространенных зарядовых состояния.

[101] Фиг. 27 демонстрирует количественное исследование, проведенное согласно типовым вариантам осуществления с применением гомодимеров, добавленных к bsAb2 в серийно разведенных известных соотношениях (серая линия и отмеченные значения на левой панели), а также показаны измеренные отношения H2L2 гомодимера (красный) и H*2L2 гомодимера (синий) в bsAb2 на основе интенсивности ХИС четырех наиболее распространенных зарядовых состояний в необработанном масс-спектре (относительное содержание каждого гомодимера 0,1%, как пример, показанный на правой панели).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[102] Примеси в биофармацевтических препаратах могут вызывать изменения, которые потенциально могут повлиять на эффективность, клиренс, безопасность и иммуногенность желаемого продукта. Например, окисление боковых цепей метионина и триптофана может влиять на связывание антител с Fc рецепторами и антигенами (Bertolotti-Ciarlet et al. Mol. Immunol. (2009) 46: 1878-1882; Pan et al. Protein Sci. (2009) 18 : 424-433; Wei et al. Anal. Chem. (2007) 79: 2797-2805; и Wang et al. Mol. Immunol. (2011) 48: 860-866).

[103] Традиционные анализы чистоты антител на основе разделения, такие как методы на основе электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), не характеризуются разрешением, необходимым для отличия этих примесей от желаемого продукта. Картирование пептидов с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (RPLC - англ.: reverse phase liquid chromatography) в сочетании с масс-спектрометрией, применяемой для мониторинга РТМ, имеет некоторые ограничения, поскольку процесс подготовки образца для RP-LC-MS является длительным, а в некоторых случаях хроматографические условия, такие как высокая температура, органические растворители, а кислое значение рН может вызвать артефакты окисления.

[104] Кроме того, некоторые методы эксклюзионной хроматографии или ионообменной хроматографии также могут применяться для отделения примесей от желаемого продукта. Отделенные примеси и желаемый продукт можно дополнительно проанализировать с помощью масс-спектрометра. Однако подвижная фаза из колонки для эксклюзионной хроматографии или ионообменной хроматографии не может быть напрямую введена в масс-спектрометр и требует дополнительных этапов, включая замену подвижной фазы (см. Фиг.1).

[105] Принимая во внимание ограничения существующих методов, был разработан

эффективный и действенный способ идентификации и количественного определения примесей с применением новой системы эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом и масс-спектрометрии, как описано в данном документе. Система эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом и масс-спектрометрии улучшает чувствительность и способность количественного определения примесей, присутствующих на очень низких уровнях, благодаря эффективному разделению в смешанном режиме и чувствительному онлайн MS-детектированию, чего нельзя достичь с помощью других типовых анализов.

[106] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом обычной квалификации в области, к которой принадлежит это изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут применяться на практике или при тестировании, в данном документе описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в настоящее описание посредством ссылки.

[107] Употребляемый в единственном числе термин следует понимать как означающий «по меньшей мере один»; а термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартную вариацию, понятную специалистам в данной области техники; и в тех случаях, когда приведены диапазоны, также включены конечные точки.

Целевой белок

[108] Биофармацевтические продукты должны демонстрировать высокий уровень активности, чистоты и низкий уровень структурной гетерогенности. Структурная гетерогенность часто влияет на биоактивность и эффективность лекарственного препарата. Следовательно, характеристика и количественная оценка терапевтического белка и/или примесей важны при разработке фармацевтических препаратов. Структурная гетерогенность в белке может возникать в результате посттрансляционных модификаций, а также присущих им химических модификаций во время изготовления и при определенных условиях хранения. Для белков, производимых в биотехнологической промышленности, могут потребоваться дополнительные методы разделения как для очистки целевого белка, так и для получения точной картины качества конечного продукта. Комплексность продукта исключает применение простых одномерных стратегий разделения. Следовательно, необходим точный и эффективный способ обнаружения и/или количественного определения терапевтического белка и/или примесей.

[109] В некоторых типовых вариантах осуществления, в настоящем изобретении предлагается способ количественной оценки и/или обнаружения белка и/или примеси в образце.

[110] В данном контексте термин «белок» включает любой аминокислотный полимер, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или

большее количество полимерных цепей аминокислот, в общем случае известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и его синтетических не встречающихся в природе аналогов, связанных пептидными связями, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов. «Синтетические пептиды или полипептиды» относятся к не встречающемуся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды можно синтезировать, например, с помощью автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные способы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или множество полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, применяемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других слитых с химерным Fc-рецептором белков, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител и биспецифических антител. В другом типовом аспекте белок может включать фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с помощью систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как бакуловирусная система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Для ознакомления с недавним обзором, в котором обсуждаются биотерапевтические белки и их продуцирование, см. Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (*Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* (2012) 147-75). В некоторых вариантах осуществления, белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Эти модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, белок FLAGtag, белок, связывающий мальтозу (MBP - англ.: maltose binding protein), хитинсвязывающий белок (CBP - англ.: chitin binding protein), глутатион-S-трансферазу (GST - англ.: glutathione-S-transferase), мус-эпитоп, флуоресцентные метки, а также другие красители и т.п. Белки можно классифицировать на основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

[111] В некоторых типовых вариантах осуществления белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело или их комбинации.

[112] В данном контексте термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидных цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит только один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения, FR антитела к big-ET-1 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или большего количества CDR. В данном контексте термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полноразмерных молекул антитела. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., применяемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с применением любых пригодных стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методы рекомбинантной ДНК и генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитела), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с применением методов молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или большего количества переменных и/или константных доменов в пригодную конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и так далее.

[113] В данном контексте «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как антигенсвязывающая или переменная область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, помимо прочего, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd',

фрагмент Fd и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), а также третичную структуру, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. В некоторых типовых вариантах осуществления, фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность родительского антитела, фрагментом которого он является, который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых типовых вариантах осуществления, фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сравнимой с аффинностью родительского антитела, и/или конкурирует с родительским антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела можно получить любым способом. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем фрагментации интактного антитела и/или фрагмент антитела может быть получен рекомбинантно из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В альтернативном или дополнительном варианте, фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно включать одноцепочечный фрагмент антитела. В альтернативном или дополнительном варианте, фрагмент антитела может включать множество цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно включать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот и более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

[114] Фраза «биспецифическое антитело» включает антитело, способное избирательно связывать два или большее количество эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь специфически связывает другой эпитоп - либо с двумя разными молекулами (например, антигенами), либо с одной и той же молекулой (например, с одним и тем же антигеном). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один-два, три или четыре порядка величины ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут быть на одной или разных мишенях (например, на том же или другом белке). Биспецифические антитела могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, распознающих разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие

последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина. Типовое биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен C_H1, шарнир, домен C_H2 и домен C_H3, а также легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью или которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или большее количество эпитопов, связанных антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может ассоциироваться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. BsAb можно разделить на два основных класса: те, которые содержат Fc-область (IgG-подобную), и те, у которых отсутствует Fc-область, причем последняя обычно меньше, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные bsAb могут иметь разные форматы, такие как, помимо прочего, триомаб, выступы-во-впадины IgG (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, двойные переменные домены Ig (DVD-Ig), два в одном или двойного действия Fab (DAF), IgG-одноцепочечный Fv (IgG-scFv) или κλ-тела. Не-IgG-подобные различные форматы включают тандемные scFv, формат диатела, одноцепочечные диатела, тандемные диатела (TandAb), переориентирующуюся молекулу с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, нанотела или антитела, продуцируемые методом «стыковка-и-замок» (dock-and-lock - DNL) метод. Fan et al. и Kontermann и Brinkmann представляют подробный обзор биспецифических антител (Fan et al. «Bispecific antibodies and their applications» J. Hematol. Oncol. (2015) 8:130; Kontermann and Brinkmann. «Bispecific antibodies» Drug Discov. Today (2015) 20: 838-847). Способы получения BsAb не ограничиваются квадратной технологией, основанной на соматическом слиянии двух разных линий гибридных клеток, химической конъюгации, которая включает химические перекрестные линкеры, и генетических подходах с применением технологии рекомбинантной ДНК. Примеры bsAb включают те, которые описаны в следующих патентных заявках, полностью включенных в данный документ посредством ссылки: заявке на патент США № 8 586 713, поданной 25 июня 2010 г.; заявке на публикацию патента США № 2013/0045492, поданной 5 июня 2012 г.; заявке на патент США № 9 657 102 поданной 19 сентября 2013 г.; заявке на публикацию патента США № 2016/0024147, поданной 24 июля 2015 г.; заявке на публикацию патента США № 2018/0112001, поданной 22 сентября 2017 г.; заявке на публикацию патента США № 2018/0104357, поданной 22 сентября 2017 г.; заявке на публикацию патента США № 2017/0174779, поданной 21 декабря 2016 г.; заявке на публикацию патента США № 2017/0174781, поданной 21 декабря 2016 г.; заявке на патент США № 10179819, поданной 29 июля 2016 г.; и заявке на публикацию патента США № 2018/0134794, поданной 15 ноября 2017 г. Низкие уровни гомодимерных примесей могут присутствовать на нескольких этапах изготовления биспецифических антител. Обнаружение таких гомодимерных примесей может быть затруднительным при выполнении анализа массы исходного вещества из-за низкого содержания примесей

гомодимера и коэлюирования этих примесей с основными видами при выполнении обычного метода жидкостной хроматографии (как продемонстрировано на Фиг. 2)

[115] Терапевтические биспецифические антитела (bsAb) могут одновременно связываться с двумя различными мишенями и обещают достижение повышенной терапевтической эффективности, предлагая двойную функциональность или новые механизмы действия (Marie Godar et al., *Therapeutic bispecific antibody formats: a patent applications review (1994-2017)*, 28 EXPERT OPINION ON THERAPEUTIC PATENTS 251-276 (2018)). На сегодняшний день разработано и оценено более 60 биспецифических молекул для лечения различных заболеваний, многие из которых имеют структуру, подобную IgG, благодаря известным преимуществам (стабильность, период полужизни в сыворотке и т.д.) при терапевтическом применении (Christoph Spiess, Qianting Zhai & Paul J. Carter, *Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies*, 67 MOLECULAR IMMUNOLOGY 95-106 (2015); M X Sliwkowski & I Mellman, *Antibody therapeutics in cancer.*, 341 SCIENCE 1192-1198 (2013); Paul J. Carter, *Potent antibody therapeutics by design*, 6 NATURE REVIEWS IMMUNOLOGY 343-357 (2006)). Биспецифические антитела часто продуцируются в одной клетке путем совместной экспрессии различных легких и тяжелых цепей. Впоследствии сборка конструкции bsAb требует правильного спаривания родственных легких и тяжелых цепей, а также гетеродимеризации двух разных полумолекул. К сожалению, этот процесс может также привести к образованию неправильно собранных молекулярных конструкций, таких как моноспецифические молекулы (например, гомодимерные виды). В отличие от других примесей, удаление гомодимерных видов посредством последующей очистки может быть сложной задачей, поскольку они часто проявляют очень похожие физико-химические свойства с ожидаемыми продуктами bsAb. Чтобы улучшить точность воспроизведения спаривания полипептидных цепей и, следовательно, способствовать образованию bsAb, в последние годы были разработаны различные стратегии (Shixue Chen et al., *Immunoglobulin Gamma-Like Therapeutic Bispecific Antibody Formats for Tumor Therapy*, 2019 JOURNAL OF IMMUNOLOGY RESEARCH 1-13 (2019)). Например, во избежание неправильного спаривания между легкой и тяжелой цепями, особенно успешным было применение идентичной легкой цепи для каждого антигенсвязывающего плеча bsAb (A. Margaret Merchant et al., *An efficient route to human bispecific IgG*, 16 NATURE BIOTECHNOLOGY 677-681 (1998)). Кроме того, гетеродимеризация различных тяжелых цепей может быть значительно облегчена с помощью технологии «выступы-во-впадины» (John B.b. Ridgway, Leonard G. Presta & Paul Carter, *'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization*, 9 «PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION» 617-621 (1996)), при которой специфические мутации конструируются в Fc-части антитела, чтобы способствовать образованию гетеродимера. В альтернативном варианте, модулируя аффинность связывания с белком А посредством аминокислотных замен в Fc-части, bsAb также может быть эффективно выделено из гомодимерных примесей во время этапа очистки белка А (Adam Zwolak et al., *Rapid Purification of Human Bispecific Antibodies via*

Selective Modulation of Protein A Binding, 7 SCIENTIFIC REPORTS 15521 (2017)). Эта стратегия уже успешно реализована для массового изготовления bsAb для клинических исследований (Andrew D. Tustian et al., *Development of purification processes for fully human bispecific antibodies based upon modification of protein A binding avidity*, 8 MABS 828-838 (2016)).

[116] Достижения в области новых форматов bsAb посредством инженерии белков и разработки процессов сделали возможным крупномасштабное изготовление терапевтических bsAb с высокой чистотой. Однако присутствие гомодимерных примесей с низким содержанием в лекарственных препаратах bsAb все еще возможно, и его необходимо регулярно контролировать во время разработки и тестирования высвобождения. Гомодимерные антитела, рассматриваемые как примеси, связанные с лекарственным продуктом, могут быть очень похожи на желаемое bsAb по многим свойствам, что делает их обнаружение и количественное определение уникальной и сложной задачей для современных аналитических способов. Поскольку гомодимерные виды обычно демонстрируют отличительные молекулярные массы по сравнению с соответствующими bsAb, измерение массы на уровне интактного белка с помощью технологий, основанных на LC-MS, было методом выбора для их характеристики (R. Jeremy Woods et al., *LC-MS characterization and purity assessment of a prototype bispecific antibody*, 5 MABS 711-722 (2013); Wolfgang Schaefer et al., *Heavy and light chain pairing of bivalent quadroma and knobs-into-holes antibodies analyzed by UHR-ESI-QTOF mass spectrometry*, 8 MABS 49-55 (2015); Frank D. Macchi et al., *Absolute Quantitation of Intact Recombinant Antibody Product Variants Using Mass Spectrometry*, 87 ANALYTICAL CHEMISTRY 10475-10482 (2015); Luis Schachner et al., *Characterization of Chain Pairing Variants of Bispecific IgG Expressed in a Single Host Cell by High-Resolution Native and Denaturing Mass Spectrometry*, 88 ANALYTICAL CHEMISTRY 12122-12127 (2016); Yiyuan Yin et al., *Precise quantification of mixtures of bispecific IgG produced in single host cells by liquid chromatography-Orbitrap high-resolution mass spectrometry*, 8 MABS 1467-1476 (2016); Chunlei Wang et al., *A systematic approach for analysis and characterization of mispairing in bispecific antibodies with asymmetric architecture*, 10 MABS 1226-1235 (2018); Markus Habegger et al., *Rapid characterization of biotherapeutic proteins by size-exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry*, 8 MABS 331-339 (2015); François Debaene et al., *Time Resolved Native Ion-Mobility Mass Spectrometry to Monitor Dynamics of IgG4 Fab Arm Exchange and "Bispecific" Monoclonal Antibody Formation*, 85 ANALYTICAL CHEMISTRY 9785-9792 (2013)). Например, несколько лабораторий сообщили об применении обращенно-фазовой хроматографии (RPLC - англ.: reversed phase chromatography) в сочетании с масс-спектрометрией высокого разрешения с определением точной массы (high-resolution accurate-mass - HRAM) для количественного определения гомодимерных примесей в образцах bsAb (Woods et al, 2013, *supra*; Schachner et al, 2016, выше; Yin et al, 2016, выше). В большинстве этих исследований гомодимерные примеси можно было обнаружить и количественно определить без хроматографического

разделения от основных видов bsAb. Действительно, учитывая большой размер (~ 150 кДа), а также сходство физико-химических свойств, часто может быть сложной задачей достичь достаточного разделения между гомодимерными антителами и bsAb с помощью метода RPLC. В результате, методы на основе RPLC-MS часто не обладают чувствительностью при обнаружении гомодимерных видов, присутствующих на низких уровнях (самый низкий зарегистрированный LLOQ составляет ~ 1% (Schachner et al, 2016, supra; Yin et al, 2016, выше), в основном из-за подавления ионов от коэлюирующих и значительно более многочисленных видов bsAb. Более того, без хроматографического разделения обнаружение гомодимерных видов с молекулярными массами, близкими к bsAb, может быть особенно проблематичным, поскольку варианты формы bsAb из PTM (например, +128 Да для С-концевого Lys и +162 для гликирования) или образование аддукции, потенциально может помешать анализу. Наконец, в случаях, когда хроматографическое разделение между гомодимером и bsAb достигается методом RPLC, количественное определение на основе MS все еще может быть затруднено из-за несоответствия в эффективности ионизации антител, элюируемых с разным временем удерживания в разных композициях растворителей, что требует построения внешней калибровочной кривой с применением добавленных стандартов при проведении количественного анализа (Risto Kostianen & Tiina J. Kauppila, *Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry*, 1216 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 685-699 (2009)). В альтернативном варианте, нативная масс-спектрометрия представляет собой еще один ценный метод анализа интактных белков и интегрирована во многие рутинные аналитические рабочие процессы для оценки гетерогенности моноклональных антител (mAb) (Habegger et al, 2016, выше; Sara Rosati et al., *Qualitative and Semiquantitative Analysis of Composite Mixtures of Antibodies by Native Mass Spectrometry*, 84 ANALYTICAL CHEMISTRY 7227-7232 (2012); Anthony Ehkirch et al., *Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products*, 1086 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 176-183 (2018); Guillaume Terral, Alain Beck & Sarah Cianféroni, *Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization*, 1032 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 79-90 (2016); Oscar Hernandez-Alba et al., *Native Mass Spectrometry, Ion Mobility, and Collision-Induced Unfolding for Conformational Characterization of IgG4 Monoclonal Antibodies*, 90 ANALYTICAL CHEMISTRY 8865-8872 (2018)). Из-за более концентрированного сигнала, генерируемого меньшим количеством зарядовых состояний, нативная MS может иметь улучшенную чувствительность по сравнению с RPLC-MS. Например, Rosati et al. (выше) сообщили об применении нативной MS для изучения бинарной смеси двух коэкспрессированных антител IgG1. Однако без эффективного хроматографического разделения, обнаружение и количественный анализ гомодимерных видов, присутствующих в низких концентрациях, по-прежнему является сложной задачей по тем же причинам, которые обсуждались выше.

[117] На сегодняшний день имеется ограниченное количество сообщений об аналитических методах, основанных на хроматографическом разделении для обнаружения и количественного определения гомодимерных видов в образцах bsAb. Например, посредством хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC - англ.: hydrophobic interaction chromatography) (Wang et al., 2018, выше) или ионообменной хроматографии (IEX - англ.: ion exchange chromatography) (A. F. Labrijn et al., *Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange*, 110 PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 5145-5150 (2013); Michael J Gramer et al., *Production of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange*, 5 MABS 962-973 (2013)) было продемонстрировано, что bsAb отделяется от его гомодимеров, если они имеют достаточно разные значения гидрофобности или изоэлектрической точки (pI), соответственно. Кроме того, последние достижения в технологиях онлайн IEX-нативной MS (Yuetian Yan et al., *Ultrasensitive Characterization of Charge Heterogeneity of Therapeutic Monoclonal Antibodies Using Strong Cation Exchange Chromatography Coupled to Native Mass Spectrometry*, 90 ANALYTICAL CHEMISTRY 13013-13020 (2018); Florian Füssl et al., *Charge Variant Analysis of Monoclonal Antibodies Using Direct Coupled pH Gradient Cation Exchange Chromatography to High-Resolution Native Mass Spectrometry*, 90 ANALYTICAL CHEMISTRY 4669-4676 (2018); Aaron O. Bailey et al., *Charge variant native mass spectrometry benefits mass precision and dynamic range of monoclonal antibody intact mass analysis*, 10 MABS 1214-1225 (2018)) обеспечивают эффективный подход для чувствительного обнаружения гомодимерных видов низкого уровня в bsAb. Однако из-за высокого разрешения IEX обычно генерирует сложный профиль заряда для каждого из всех антител на основе гетерогенности их заряда, которые, вероятно, будут перекрываться друг с другом. Более того, количественное определение на основе MS с применением этого подхода может быть затруднено, так как все отдельные формы вариантов заряда каждой молекулы необходимо суммировать для расчета. Кроме того, аналогично подходу на основе RPLC, метод IEX использует градиентное элюирование, что, вероятно, поставит под угрозу количественное определение на основе MS из-за различной эффективности ионизации антител, элюируемых в различных условиях растворителя (например, pH или концентрации соли). Недавно для изучения гетерогенности антител был применен метод хроматографии со смешанным режимом на основе SEC (ММ-SEC), который разделяет аналиты как по гидродинамическому объему, так и по гидрофобным взаимодействиям с матрицей колонки (Xiaoyu Yang et al., *Analysis and purification of IgG4 bispecific antibodies by a mixed-mode chromatography*, 484 ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 173-179 (2015); Cintyu Wong, Camille Strachan-Mills & Sudhir Burman, *Facile method of quantification for oxidized tryptophan degradants of monoclonal antibody by mixed mode ultra performance liquid chromatography*, 1270 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 153-161 (2012); Jorge Alexander Pavon et al., *Analysis of monoclonal antibody oxidation by simple mixed mode chromatography*, 1431 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 154-165 (2016)). В сочетании с УФ- или флуоресцентным детектированием метод ММ-SEC был успешно применен для

относительного количественного определения гомодимерных видов в образце bsAb (Yang et al, 2015, выше). Однако очевидно, что полезность этого метода может быть ограничена случаями, когда гомодимерные виды и bsAb существенно различаются по гидрофобности, так что исходное разделение может быть достигнуто для количественного определения на основе УФ или флуоресценции. Более того, поскольку идентификация гомодимерных видов основывалась исключительно на сопоставлении времени удерживания со стандартами, всегда существовал риск завышения относительной численности, если они элюируются совместно с олигомерными или усеченными формами молекулы bsAb.

[118] Концепция хроматографии со смешанным режимом с применением колонки SEC берет свое начало из нежелательных вторичных взаимодействий между анализируемыми белками и матрицей колонки. В идеальном варианте, SEC должна разделять аналиты белка исключительно на основе их гидродинамического объема. На практике, электростатические, гидрофобные и водородные взаимодействия могут вносить вклад в удержание и разделение белков в различной степени, в зависимости от матрицы колонки, условий буфера и характеристик белка (Alexandre Goyon et al., *Unraveling the mysteries of modern size exclusion chromatography - the way to achieve confident characterization of therapeutic proteins*, 1092 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 368-378 (2018); Tsutomu Arakawa et al., *The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals*, 99 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1674-1692 (2010)). Использование этих вторичных взаимодействий во время SEC-разделения путем надлежащей оптимизации хроматографических условий предоставляет возможности для улучшения разделения антител с аналогичным гидродинамическим объемом, но с различными характеристиками поверхности (например, зарядом и гидрофобностью). При использовании MS-совместимых подвижных фаз, онлайн сочетание SEC со смешанным режимом с обнаружением посредством нативной MS (MM-SEC-MS) может иметь много преимуществ по сравнению с методами на основе УФ, включая однозначную идентификацию гомодимерных видов путем точных измерений массы, минимального влияния совместно элюирующих частиц и менее строгих требований к хроматографическому разрешению (Terral et al., 2016, выше; Goyon et al., 2017, выше).

[119] В данном контексте термин «мультиспецифическое антитело» или «Mab» относится к антителу со специфичностью связывания по меньшей мере с двумя разными антигенами. Хотя такие молекулы обычно связывают только два антигена (т.е. биспецифические антитела, BsAb), антитела с дополнительной специфичностью, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИТ, также могут быть рассмотрены в системе и способа, описанных в данном документе.

[120] В данном контексте термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любыми способами, доступными или известными в

данной области техники. Моноклональные антитела, применимые в соответствии с настоящим описанием, могут быть получены с помощью широкого разнообразия методик, известных в данной области техники, включая применение гибридомных, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

[121] На многих этапах изготовления биофармацевтических препаратов могут образовываться примеси. Примеси, полученные в ходе биотехнологического процесса, может быть очень трудно охарактеризовать и количественно определить, поскольку они часто присутствуют в очень низких количествах и могут представлять собой очень сложные виды или смеси видов. Также может быть очень трудно получить подлинный эталон пиков таких примесей. При этом полная характеристика следовых количеств примеси белка становится трудоемким, длительным и часто очень дорогостоящим процессом. Часто примесь может включать варианты, изоформы, продукты разложения, родственные примеси, технологические примеси, незначительные посттрансляционные модификации, агрегаты или обрезанные фрагменты интактного рекомбинантного белка. Существует почти бесконечное количество возможных примесей, большинство из которых, но не все, могут быть известны.

[122] В данном контексте термин «целевой белок» может включать желаемый продукт или примесь, или и то, и другое.

[123] В данном контексте термин «желаемый продукт» относится к белку, который имеет желаемую структуру, функцию или профиль эффективности.

[124] В данном контексте термин «примесь» может включать любой нежелательный белок, присутствующий в биофармацевтическом продукте. Примеси могут включать технологические примеси и родственные примеси. Кроме того, примесь может иметь известную структуру, частично охарактеризованную или неидентифицированную. Технологические примеси могут быть получены в процессе изготовления и могут включать три основные категории: происходящие из клеточного субстрата, происходящие из клеточной культуры и возникающие в ходе последующих этапов процесса. Примеси, происходящие из клеточного субстрата, включают, помимо прочего, белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или общую ДНК клетки-хозяина). Примеси, происходящие из клеточных культур, включают, помимо прочего, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, возникающие в ходе последующих этапов процесса, включают, помимо прочего, ферменты, химические и биохимические процессинговые реагенты (например, цианогенбромид, гуанидин, окислители и восстановители), неорганические соли (например, тяжелые металлы, мышьяк, неметаллические ионы), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие выщелачиваемые агенты. Родственные примеси (например, предшественники, определенные продукты разложения), могут быть молекулярными вариантами, возникающими в процессе изготовления и/или хранения, которые не обладают свойствами, сопоставимыми со свойствами желаемого продукта в отношении активности,

эффективности и безопасности. Такие варианты могут потребовать значительных усилий при выделении и характеристике, чтобы идентифицировать тип модификации (модификаций). Родственные примеси могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются гидролитическими ферментами или химическими веществами, которые катализируют расщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают, помимо прочего, дезамидированные, изомеризованные, несовпадающие S-S-связанные, окисленные или измененные конъюгированные формы (например, гликозилирование, фосфорилирование). Модифицированные формы могут также включать любую форму пост-трансляционной модификации. Агрегаты включают димеры и более высокие количества желаемого продукта. (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept. of Health and Human Services).

[125] В данном контексте общий термин «посттрансляционные модификации» или «PTM» относится к ковалентным модификациям, которым подвергаются полипептиды во время (котрансляционная модификация) или после (посттрансляционная модификация) их рибосомного синтеза. PTM обычно вводятся определенными ферментами или ферментными путями. Многие из них возникают на участке определенной характерной белковой последовательности (сигнатурной последовательности) внутри белкового каркаса. Зарегистрировано несколько сотен PTM, и эти модификации неизменно влияют на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. «Proteins» (2014), второе издание, опубликованное Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансляционные модификации включают, помимо прочего, расщепление, удлинение N-конца, разложение белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование остатков лизина биотином), амидирование C-конца, гликозилирование, йодирование, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование (добавление ацетильной группы, обычно на N-конце белка), алкилирование (добавление алкильной группы (например, метила, этила, пропила) обычно на остатках лизина или аргинина), метилирование, аденилирование, ADP-рибозилирование, ковалентные поперечные связи внутри или между полипептидными цепями, сульфирование, пренилирование, зависящие от витамина С модификации (гидроксилирование пролина и лизина и карбоксиконцевое амидирование), зависящая от витамина К модификация, при которой витамин К является кофактором при карбоксилировании остатков глутаминовой кислоты, приводящем к образованию γ -карбоксиглутамата (остаток глюкозы), глутамилирование (ковалентное связывание остатков глутаминовой кислоты), глицилирование (ковалентное связывание остатков глицина), гликозилирование (добавление гликозильной группы к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, в результате чего получают гликопротеин), изопренилирование (добавление изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липоилирование (присоединение липоатной функциональности), фосфопантетеинилирование (добавление 4'-фосфопантетеинильного фрагмента из

кофермента А, как в жирной кислоте, поликетиде, нерибосомного пептида и биосинтеза лейцина), фосфорилирование (добавление фосфатной группы, обычно к серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфатирование (добавление сульфатной группы, обычно к остатку тирозина). Посттрансляционные модификации, которые изменяют химическую природу аминокислот, включают, помимо прочего, цитруллинирование (превращение аргинина в цитруллин путем дезиминирования) и дезамидирование (превращение глутамина в глутаминовую кислоту или аспарагина в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, которые включают структурные изменения, включают, помимо прочего, образование дисульфидных мостиков (ковалентное связывание двух аминокислот цистеина) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). Некоторые посттрансляционные модификации включают добавление других белков или пептидов, таких как ISG-илирование (ковалентное связывание с белком ISG15 (ген, стимулированный интерфероном)), SUMO-илирование (ковалентное связывание с белком SUMO (Малый убиквитин-подобный модификатор)) и убиквитинирование (ковалентное связывание с белком убиквитином). См. <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> для более подробного контролируемого словаря РТМ, рекомендованного UniProt.

Эксклюзионная хроматография со смешанным режимом

[126] В данном контексте термин «хроматография» относится к процессу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью или газом, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального распределения химических соединений, когда они протекают вокруг или над неподвижной жидкой или твердой фазой.

[127] В данном контексте термин «хроматография со смешанным режимом (ММС)» или «мультимодальная хроматография» включает хроматографический метод, в котором растворенные вещества взаимодействуют с неподвижной фазой посредством более чем одного режима или механизма взаимодействия. ММС можно применять в качестве альтернативы или дополнения к традиционной обращенно-фазовой (RP - англ.: reversed-phased), ионообменной (IEX - англ.: ion exchange) и нормально-фазовой хроматографии (NP - англ.: normal phase). В отличие от хроматографии RP, NP и IEX, в которой гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие и ионное взаимодействие, соответственно, являются доминирующими режимами взаимодействия, хроматография со смешанным режимом может использовать комбинацию двух или более из этих режимов взаимодействия. Среда для хроматографии со смешанным режимом может обеспечить уникальную селективность, которую невозможно воспроизвести с помощью хроматографии с одним режимом. Хроматография со смешанным режимом также может обеспечить потенциальную экономию затрат и гибкость работы по сравнению с методами, основанными на аффинности.

[128] Фраза «эксклюзионная хроматография» или «SEC» или «гель-фильтрация» включает метод жидкостной колоночной хроматографии, который позволяет сортировать молекулы в растворе по размеру.

[129] В данном контексте термины «смола для SEC хроматографии» или «среда для SEC хроматографии» применяются в настоящем документе взаимозаменяемо и могут включать любой вид твердой фазы, применяемой в SEC, которая отделяет примеси от желаемого продукта (например, гомодимерный контаминант для продукта биспецифических антител). Объем смолы, длина и диаметр применяемой колонки, а также динамическая производительность и скорость потока могут зависеть от нескольких параметров, таких как объем обрабатываемой жидкости, концентрация белка в жидкости, которая будет подвергнута процессу по настоящему изобретению, и т.д. Определение этих параметров для каждого этапа находится в пределах уровня квалификации специалиста в данной области техники.

[130] В данном контексте термин «эксклюзионная хроматография со смешанным режимом» или «ММ-SEC» может включать любой хроматографический метод, который разделяет белки посредством дополнительного взаимодействия, отличного от разделения в зависимости от их размера. Дополнительное или вторичное взаимодействие может использовать один или большее количество из следующих механизмов: анионный обмен, катионный обмен, гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие, взаимодействие заряд-заряд, водородная связь, пи-пи-связь и аффинность к металлу. Смола для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом может относиться к любому типу твердой фазы, применяемой для ММ-SEC разделения. Неограничивающими примерами являются Sepax Zenix SEC-300, Waters ВЕН 300 или Agilent Bio SEC-3.

[131] В данном контексте термин «гидрофобная функциональность» относится к гидрофобному взаимодействию белка с SEC хроматографической смолой как вторичному взаимодействию. Гидрофобная функциональность также может значительно изменять форму пика, что может оказать заметное влияние на разрешающую способность процесса. Гидрофобные взаимодействия наиболее сильны при высокой ионной силе подвижной фазы. Для выбора подвижной фазы с целью включения гидрофобных функциональных групп в смолу различные ионы могут быть расположены в так называемом солюфобном ряду в зависимости от того, способствуют ли они гидрофобным взаимодействиям (эффект высаливания) или нарушают структуру воды (хаотропный эффект) и приводят к ослаблению гидрофобного взаимодействия (как продемонстрировано на Фиг. 3). Катионы ранжируются по возрастанию эффекта высаливания в следующем порядке: Ba^{++} ; Ca^{++} ; Mg^{++} ; Li^{+} ; Cs^{+} ; Na^{+} ; K^{+} ; Rb^{+} ; NH_4^{+} , тогда как анионы можно проранжировать по возрастанию хаотропного эффекта в следующем порядке: PO_4^{-} ; SO_4^{-} ; $CH_3CO_2^{-}$; Cl^{-} ; Br^{-} ; NO_3^{-} ; ClO_4^{-} ; I^{-} ; SCN^{-} . В целом сульфаты Na, K или NH_4 эффективно способствуют взаимодействию «лиганд-белок» при НИС. Могут быть составлены соли, влияющие на силу взаимодействия, определяемую следующим соотношением: $(NH_4)_2SO_4 > Na_2SO_4 > NaCl > NH_4Cl > NaBr > NaSCN$.

Масс-спектрометрия

[132] В данном контексте термин «масс-спектрометр» включает устройство, способное обнаруживать определенные молекулярные частицы и точно измерять их

массы. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в который можно элюировать полипептид или пептид для обнаружения и/или характеристики. Масс-спектрометр может включать три основные части: источник ионов, масс-анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры аналита могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы одновременно (как при ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов в значительной мере зависит от области применения.

[133] В данном контексте термин «масс-анализатор» включает устройство, которое может разделять частицы, то есть атомы, молекулы или кластеры, в соответствии с их массой. Неограничивающими примерами масс-анализаторов, которые можно применять для быстрого секвенирования белков, являются времяпролетный (TOF - англ.: time-of-flight), магнитный/электрический сектор, квадрупольный масс-фильтр (Q), квадрупольная ионная ловушка (QIT - англ.: quadrupole ion trap), орбитальная ловушка, ионно-циклотронный резонанс с преобразованием Фурье (FTICR - англ.: Fourier transform ion cyclotron resonance), а также методика ускорительной масс-спектрометрии (AMS - англ.: accelerator mass spectrometry).

[134] В данном контексте термин «тандемная масс-спектрометрия» включает метод, при котором структурную информацию о молекулах образца получают с использованием нескольких этапов отбора и разделения по массам. Предварительным условием является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в неизменном виде, и что можно индуцировать их распад некоторым прогнозируемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массам. Многоэтапная MS/MS или MSⁿ может быть выполнена путем выбора и выделения иона-предшественника (MS²), его фрагментирования, выделения иона первичного фрагмента (MS³), его фрагментирования, выделения вторичного фрагмента (MS⁴), и так далее до тех пор, пока можно получить значимую информацию или сигнал фрагментного иона, который поддается обнаружению. Тандемную MS успешно проводили с широким спектром комбинаций анализаторов. Выбор анализаторов для комбинации с целью определенного применения, определяется множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размером, стоимостью и доступностью. Две основные категории методов тандемной MS - это тандем-в-пространстве и тандем-во-времени, но есть также гибриды, когда анализаторы «тандем-во-времени» соединяются в пространстве или с анализаторами «тандем-в-пространстве».

[135] В некоторых типовых вариантах осуществления, масс-спектрометрию можно проводить в естественных условиях.

[136] В данном контексте термин «нативные условия», «нативная MS» или «нативная ESI-MS» может включать выполнение масс-спектрометрии в условиях, которые сохраняют нековалентные взаимодействия в аналите. Подробную информацию о нативной MS см. в обзоре: Elisabetta Boeri Erba & Carlo Petosa, *The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes*,

24 PROTEIN SCIENCE 1176-1192 (2015). Некоторые различия между нативной ESI и обычной ESI продемонстрированы в Таблице 1 (Hao Zhang et al., *Native mass spectrometry of photosynthetic pigment-protein complexes*, 587 FEBS Letters 1012-1020 (2013)).

Таблица 1.

	Нативная ESI	Обычная ESI
Раствор образца	Водный раствор вода, ацетат аммония	Частичный органический раствор вода, муравьиная кислота, ацетонитрил/метанол (pH 1-2)
Условия распыления	10-50 нл/мин Напряжение при распылении 0,8-1,5 кВ Температура 20-30 °С	10-50 нл/мин Напряжение при распылении 0,8-1,5 кВ Температура 20-30 °С
Обработка солью	Обессоливание вне линии	Обессоливание онлайн/оффлайн с помощью RP-HPLC
Концентрация белка	1-10 мкМ (комплекс)	<1 мкМ (субъединица)
Выходная информация	Молекулярная масса белкового комплекса и субъединицы Нековалентные взаимодействия Стехиометрия Структура	Молекулярная масса одной субъединицы

Типовые варианты осуществления

[137] Описанные в данном документе варианты осуществления представляют собой композиции, способы и системы для быстрой характеристики белков в образце.

[138] В данном контексте термины «включать», «включает» и «включающий» не следует понимать как ограничивающие и означают «содержать», «содержит» и «содержащий», соответственно.

[139] В настоящем изобретении предлагаются способы обнаружения или количественного определения примеси в образце, включающие приведение образца в контакт с хроматографической системой, содержащей смолу для хроматографии со смешанным режимом; промывку смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, включающего примеси; и обнаружение примеси в элюенте с помощью масс-спектрометра.

[140] В настоящем изобретении предлагаются способы обнаружения или количественного определения целевого белка в образце, включающие приведение образца

в контакт с хроматографической системой, имеющей смолу для хроматографии со смешанным режимом, промывку смолы для хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, включающего целевой белок, и обнаружение или количественное определение целевого белка в элюенте с помощью масс-спектрометра.

[141] В некоторых конкретных типовых вариантах осуществления, хроматографическая система может содержать смолу для эксклюзионной хроматографии с дополнительным взаимодействием.

[142] В некоторых конкретных типовых вариантах осуществления, хроматографическая система может содержать смолу для эксклюзионной хроматографии с гидрофобным взаимодействием.

[143] В некоторых конкретных типовых вариантах осуществления, хроматографическая система может содержать смолу для эксклюзионной хроматографии с функцией взаимодействия «заряд-заряд».

[144] В некоторых типовых вариантах осуществления, способ обнаружения или количественного определения примеси в образце может включать примесь, которая может включать по меньшей мере один нежелательный белок. Примесь(и) может иметь известную структуру, быть частично охарактеризованной или неидентифицированной.

[145] В некоторых типовых вариантах осуществления примесь может быть родственной примесью. Родственная примесь может представлять собой молекулярные варианты, предшественники, продукты разложения, фрагментированный белок, продукт расщепления, агрегаты, форму посттрансляционной модификации или их комбинации.

[146] В некоторых типовых вариантах осуществления примесь может быть технологической примесью. Технологическая примесь может включать примеси, полученные в процессе изготовления, то есть нуклеиновые кислоты и белки клетки-хозяина, антибиотики, сыворотку, другие компоненты среды, ферменты, химические и биохимические процессинговые реагенты, неорганические соли, растворители, носители, лиганды и другие выщелачиваемые вещества, применяемые в производственном процессе.

[147] В некоторых типовых вариантах осуществления, примесь может представлять собой белок с pI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном аспекте, примесь может быть белком с pI около 4,5, около 5,0, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1, около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9, около 8,0, около 8,1, около 8,2, около 8,3, около 8,4, около 8,5, около 8,6, около 8,7, около 8,8, около 8,9 или около 9,0.

[148] В некоторых типовых вариантах осуществления, примесь может быть гомодимерным видом. В одном аспекте, примесь может представлять собой гомодимерный вид, который может образовываться во время продуцирования биспецифического антитела. В другом аспекте, количество примесей в образце может

быть не менее двух.

[149] В некоторых типовых вариантах осуществления, количество образца, загруженного в хроматографическую систему, может находиться в диапазоне от около 10 мкг до около 100 мкг. В одном типовом варианте осуществления, количество образца, загруженного в хроматографическую систему, может составлять около 10 мкг, около 12,5 мкг, около 15 мкг, около 20 мкг, около 25 мкг, около 30 мкг, около 35 мкг, около 40 мкг, около 45 мкг, около 50 мкг, около 55 мкг, около 60 мкг, около 65 мкг, около 70 мкг, около 75 мкг, около 80 мкг, около 85 мкг, около 90 мкг, около 95 мкг или около 100 мкг.

[150] В некоторых типовых вариантах осуществления, подвижная фаза, применяемая для элюирования примеси, может быть подвижной фазой, которая может быть совместима с масс-спектрометром.

[151] В некоторых конкретных типовых вариантах осуществления, подвижная фаза может быть ацетатом аммония, бикарбонатом аммония или формиатом аммония или их комбинациями. В одном аспекте, общая концентрация подвижной фазы может составлять до около 600 мМ. В конкретном аспекте, общая концентрация подвижной фазы может составлять около 5 мМ, около 6 мМ, 7 мМ, около 8 мМ, 9 мМ, около 10 мМ, 12,5 мМ, около 15 мМ, 17,5 мМ, около 20 мМ, 25 мМ, около 30 мМ, 35 мМ, около 40 мМ, 45 мМ, около 50 мМ, 55 мМ, около 60 мМ, 65 мМ, около 70 мМ, 75 мМ, около 80 мМ, 75 мМ, около 95 мМ, 100 мМ, около 1100 мМ, 120 мМ, около 130 мМ, 140 мМ, около 150 мМ, 160 мМ, около 170 мМ, 180 мМ, около 190 мМ, 200 мМ, около 225 мМ, 250 мМ, около 275 мМ, 300 мМ, около 325 мМ, 350 мМ, около 375 мМ, 400 мМ, около 425 мМ, 450 мМ, около 475 мМ, 500 мМ, около 525 мМ, 550 мМ, около 575 мМ или около 600 мМ.

[152] В некоторых типовых вариантах осуществления, подвижная фаза может иметь скорость потока от около 0,1 мл/мин до около 0,4 мл/мин. В одном типовом варианте осуществления скорость потока подвижной фазы может составлять около 0,1 мл/мин, около 0,15 мл/мин, около 0,20 мл/мин, около 0,25 мл/мин, около 0,30 мл/мин, около 0,35 мл/мин, или около 0,4 мл/мин.

[153] В некоторых типовых вариантах осуществления, способ обнаружения или количественного определения примеси может включать обнаружение или количественное определение примеси в элюенте с помощью масс-спектрометра. В одном аспекте, масс-спектрометр может быть tandemным масс-спектрометром. В другом аспекте, масс-спектрометр может содержать нанораспылитель.

[154] В некоторых типовых вариантах осуществления, элюент может содержать целевой белок в дополнение к примеси. В одном аспекте, целевой белок может включать антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела или мультиспецифическое антитело. В конкретном аспекте, целевой белок может быть моноклональным антителом. В конкретном аспекте, целевой белок может быть терапевтическим антителом. В конкретном аспекте, целевой белок может быть белком иммуноглобулина. В другом конкретном аспекте, белок иммуноглобулина может представлять собой IgG1. В еще одном конкретном аспекте, белок иммуноглобулина может представлять собой IgG4. В

одном аспекте, целевой белок может быть биспецифическим антителом. В конкретном аспекте, биспецифическое антитело может быть моноклональным антителом к CD20/CD3. В одном аспекте, целевой белок может быть антителом, созданным с применением линии клеток фибробластов мыши MG87. В одном аспекте, целевой белок может представлять собой фрагмент антитела, образованный при расщеплении антитела.

[155] В одном аспекте, целевой белок может быть посттрансляционно модифицированным белком. В конкретном аспекте, посттрансляционно модифицированный белок может быть образован расщеплением, удлинением N-конца, разложением белка, ацилированием N-конца, биотинилированием, амидированием C-конца, окислением, гликозилированием, йодированием, ковалентным присоединением, простетических групп, ацелированием, алкилированием, метилированием, аденилированием, ADP-рибозилированием, ковалентными поперечными связями внутри или между полипептидными цепями, сульфированием, пренилированием, зависимыми от витамина С модификациями, зависимыми от витамина К модификациями, глутамированием, глицилированием, гликозилированием, дегликозилированием, изопренилированием, липоилированием, фосфопантетеинилированием, фосфорилированием, сульфатированием, цитруллинированием, дезамидированием, образованием дисульфидных мостиков, протеолитическим расщеплением, ISG-илированием, SUMO-илированием или убиквитинированием (ковалентное связывание с белком убиквитином).

[156] В другом аспекте, целевой белок может быть продуктом разложения белка.

[157] В еще одном аспекте, целевой белок может быть примесью, обнаруженной в биофармацевтическом продукте. В конкретном аспекте, целевой белок может быть примесью, обнаруженной во время изготовления биофармацевтического продукта.

[158] В одном аспекте целевой белок может быть белком с рI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0.

[159] В одном аспекте целевой белок может быть родственной примесью. Родственная примесь может представлять собой молекулярные варианты, предшественники, продукты разложения, фрагментированный белок, продукт расщепления, агрегаты, форму посттрансляционной модификации или их комбинации.

[160] В одном аспекте целевой белок может быть технологической примесью. Технологическая примесь может включать примеси, полученные в процессе изготовления, то есть нуклеиновые кислоты и белки клетки-хозяина, антибиотики, сыворотку, другие компоненты среды, ферменты, химические и биохимические процессинговые реагенты, неорганические соли, растворители, носители, лиганды и другие выщелачиваемые вещества, применяемые в производственном процессе.

[161] В одном аспекте, количество примесей в образце может быть не менее двух.

[162] В одном аспекте, посттрансляционно модифицированный белок может образовываться при окислении белка.

[163] В другом аспекте, целевой белок может включать продукт разложения.

[164] В другом аспекте, продукт разложения может включать посттрансляционную модификацию терапевтического белка

[165] В некоторых типовых вариантах осуществления, промывка смолы для хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы требует времени менее чем около 30 минут. В одном аспекте, время, необходимое для промывки смолы для хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы, может составлять около 10 минут, около 11 минут, около 12 минут, около 13 минут, около 14 минут, около 15 минут, около 16 минут, около 17 минут, около 18 минут, около 19 минут, около 20 минут, около 21 минуты, около 22 минут, около 23 минут, около 24 минут, около 25 минут, около 26 минут, около 26 минут, около 27 минут, около 28 минут, около 29 минут или около 30 минут.

[166] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая система может применяться по меньшей мере для около 3 прогонов проб без очистки. В одном аспекте, хроматографическая система может применяться по меньшей мере для около 3 прогонов проб, по меньшей мере для около 4 прогонов проб, по меньшей мере для около 5 прогонов проб, по меньшей мере для около 6 прогонов проб, по меньшей мере для около 7 прогонов проб или по меньшей мере для около 8 прогонов проб без очистки.

[167] Понятно, что способы не ограничиваются каким-либо из вышеупомянутых белков, примесей, колонок и что способы обнаружения или количественной оценки могут быть выполнены любыми пригодными средствами.

[168] В некоторых типовых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается хроматографическая система со смешанным режимом, содержащая хроматографическую колонку 110, которую можно промывать с применением подвижной фазы для обеспечения элюента, включающего целевой белок, и масс-спектрометр 120, соединенный с хроматографической колонкой (как продемонстрировано на Фиг. 4). В одном аспекте, хроматографическая колонка 110 может контактировать с образцом с помощью устройства 100 для загрузки образцов.

[169] В некоторых типовых вариантах осуществления, количество образца, которое может быть загружено в хроматографическую колонку 110, может находиться в диапазоне от около 10 мкг до около 100 мкг. В одном аспекте, количество образца, загруженного в хроматографическую колонку 110, может составлять около 10 мкг, около 12,5 мкг, около 15 мкг, около 20 мкг, около 25 мкг, около 30 мкг, около 35 мкг, около 40 мкг, около 45 мкг, около 50 мкг, около 55 мкг, около 60 мкг, около 65 мкг, около 70 мкг, около 75 мкг, около 80 мкг, около 85 мкг, около 90 мкг, около 95 мкг или около 100 мкг.

[170] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическую колонку 110 можно промывать подвижной фазой. В одном аспекте, подвижная фаза может быть ацетатом аммония, бикарбонатом аммония или формиатом аммония или их комбинациями. В одном аспекте, общая концентрация подвижной фазы, которую можно применять с хроматографической колонкой 110, может составлять до около 600 мМ. В конкретном аспекте, общая концентрация подвижной фазы, которую можно применять с

хроматографической колонкой 110, может составлять около 5 мМ, около 6 мМ, 7 мМ, около 8 мМ, 9 мМ, около 10 мМ, 12,5 мМ, около 15 мМ, 17,5 мМ, около 20 мМ, 25 мМ, около 30 мМ, 35 мМ, около 40 мМ, 45 мМ, около 50 мМ, 55 мМ, около 60 мМ, 65 мМ, около 70 мМ, 75 мМ, около 80 мМ, 75 мМ, около 95 мМ, 100 мМ, около 1100 мМ, 120 мМ, около 130 мМ, 140 мМ, около 150 мМ, 160 мМ, около 170 мМ, 180 мМ, около 190 мМ, 200 мМ, около 225 мМ, 250 мМ, около 275 мМ, 300 мМ, около 325 мМ, 350 мМ, около 375 мМ, 400 мМ, около 425 мМ, 450 мМ, около 475 мМ, 500 мМ, около 525 мМ, 550 мМ, около 575 мМ или около 600 мМ. В другом аспекте, подвижная фаза, которую можно применять с хроматографической колонкой 110, может иметь скорость потока от 0,1 мл/мин до 0,4 мл/мин. В конкретном аспекте, скорость потока подвижной фазы, которую можно применять с хроматографической колонкой 110, может составлять около 0,1 мл/мин, около 0,15 мл/мин, около 0,20 мл/мин, около 0,25 мл/мин, около 0,30 мл/мин, около 0,35 мл/мин или около 0,4 мл/мин. В другом аспекте, подвижная фаза, которую можно применять с хроматографической колонкой 110, может применяться для элюирования примеси.

[171] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая колонка 110 может быть соединена с масс-спектрометром 120. В одном аспекте, масс-спектрометр 120 может содержать нанораспылитель.

[172] В некоторых типовых вариантах осуществления, масс-спектрометр 120 может быть тандемным масс-спектрометром.

[173] В некоторых типовых вариантах осуществления, масс-спектрометр 120 может быть нативным масс-спектрометром.

[174] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 целевого белка (см. Фиг. 4). В одном аспекте, хроматографическая система со смешанным режимом может применяться для обнаружения 140 и/или количественного определения 130 одного целевого белка.

[175] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 моноклонального антитела.

[176] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 терапевтического антитела.

[177] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 белка иммуноглобулина. В одном аспекте, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 белка IgG1. В другом аспекте, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 белка IgG4. В другом аспекте,

хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 биспецифического антитела. В еще одном аспекте, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 моноклонального антитела к CD20/CD3.

[178] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 фрагмента антитела, образующегося при расщеплении антитела. В одном аспекте, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 целевого белка, который может представлять собой посттрансляционно модифицированный белок. В другом аспекте, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 целевого белка, который может быть продуктом разложения белка. В еще одном аспекте, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 целевого белка, который может быть примесью, обнаруженной в биофармацевтическом продукте. В другом аспекте, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 целевого белка, который может быть примесью, обнаруженной в биофармацевтическом продукте.

[179] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 целевого белка, который может быть белком с pI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0.

[180] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 целевого белка, который может быть примесью, связанной с лекарственным продуктом. Родственная примесь может представлять собой молекулярные варианты, предшественники, продукты разложения, фрагментированный белок, продукт расщепления, агрегаты, форму посттрансляционной модификации или их комбинации.

[181] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая система со смешанным режимом может быть способна к обнаружению 140 и/или количественному определению 130 целевого белка, который может быть технологической примесью. Технологическая примесь может включать примеси, полученные в процессе изготовления, то есть нуклеиновые кислоты и белки клетки-хозяина, антибиотики, сыворотку, другие компоненты среды, ферменты, химические и биохимические процессинговые реагенты, неорганические соли, растворители, носители, лиганды и другие выщелачиваемые вещества, применяемые в производственном процессе. В одном аспекте, количество примесей в образце может быть не менее двух.

[182] В некоторых типовых вариантах осуществления, хроматографическая колонка 110, которую можно применять по меньшей мере для около 3 прогонов проб без очистки. В одном аспекте, хроматографическая колонка 110 может применяться по меньшей мере для около 3 прогонов проб, по меньшей мере для около 4 прогонов проб, по меньшей мере для около 5 прогонов проб, по меньшей мере для около 6 прогонов проб, по меньшей мере для около 7 прогонов проб или по меньшей мере для около 8 прогонов проб без очистки.

[183] Понятно, что система не ограничивается каким-либо из вышеупомянутых элементов: белки, примеси, подвижная фаза или хроматографическая колонка.

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

[185] В тексте описания цитируются различные публикации, включая патенты, патентные заявки, опубликованные патентные заявки, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих процитированных ссылок в полном объеме и во всех целях включена в данный документ посредством ссылки.

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

ПРИМЕРЫ

[187] Материалы. Деионизированная вода подавалась встроенной системой очистки воды Milli-Q, установленной с фильтром MilliPak Express 20 (MilliporeSigma, Берлингтон, штат Массачусетс). Ацетат аммония (степень чистоты LC/MS), уксусная кислота и бикарбонат аммония (степень чистоты LC/MS) были приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури). Пептид N-гликозидаза F (ПНГаза F) была приобретена в New England Biolabs Inc (Ипсвич, штат Массачусетс). Invitrogen™ UltraPure™ 1 М Tris-HCl буфер, pH 7,5 получали от Thermo Fisher Scientific (Уолтем, штат Массачусетс). Все моноклональные антитела и биспецифические препараты, включая подклассы IgG1 и IgG4, изготавливались в Regeneron.

[188] Подготовка образцов. С целью уменьшения гетерогенности по массе, обусловленной наличием двух N-связанных гликанов в Fc-части, каждое антитело или образец смеси антител обрабатывали ПНГазой F (1 IUB миллиединица на 10 мкг белка) при 45°C в 100 mM Tris-HCl (pH 7,5) в течение 1 часа. Для приготовления вводимых стандартов смесей bsAb, лекарственное вещество bsAb сначала дополнительно очищали с помощью аналитической сильной катионообменной хроматографии (SCX - англ.: strong cation exchange chromatography) для удаления любых остаточных гомодимерных примесей, образующихся в результате крупномасштабного производственного процесса. Подробные условия SCX-фракционирования приведены ниже. После фракционирования, проводили замену буфера как для очищенного BsAb, так и для соответствующих

стандартов гомодимеров, на 50 мМ буфер Tris-HCl (pH 7,5) и довели каждый до 6 мкг/мкл на основе концентраций, определенных Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Бремен, Германия). Затем bsAb и два соответствующих гомодимера смешивали в соотношении 1:1:1. В конце выполняли последовательные разведения с применением раствора bsAb 2 мкг/мкл для приготовления серии дополнительных вводимых стандартов с уровнями гомодимера от 0,1% до 10%.

[189] Очистка bsAb от лекарственной субстанции bsAb с помощью SCX. С целью дальнейшей очистки bsAb, для каждого образца bsAb проводили аналитическую сильную катионообменную хроматографию (SCX) на системе Waters I-Class UPLC, оснащенной детектором на фотодиодной матрице (PDA) (Waters, Милфорд, штат Массачусетс, США). Перед введением образца температуру колоночного отделения устанавливали на 45°C и применяли колонку с сильным катионообменным обменом YMC-BioPro SP-F (100 мм × 4,6 мм, 5 мкм) (YMC Co., LTD., Киото, Япония). предварительно кондиционировали подвижной фазой А (20 мМ ацетат аммония, pH довели до 5,6 с помощью 20 мМ уксусной кислоты) при скорости потока 0,4 мл/мин. После введения аликвоты (200 мкг) образцов белка градиент выдерживали при 100% подвижной фазе А в течение 2 минут с последующим линейным увеличением до 100% подвижной фазы В (140 мМ ацетат аммония, 10 мМ бикарбонат аммония, pH 7,4) за 16 минут. Градиент выдерживали при 100% подвижной фазе В в течение 4 минут, а затем возвращали к 100% подвижной фазе А для восстановления колонки в течение 7 минут перед следующим введением. После фракционирования, проводили замену буфера для BsAb на тот же буфер, что и для неправильно спаренных гомодимерных образцов, перед смешиванием для приготовления вводимых стандартов.

[190] Метод MM-SEC-MS. Эксклюзионную хроматографию со смешанным режимом выполняли на системе Waters I-Class UPLC, оснащенной детектором на основе фотодиодной матрицы (PDA) (Waters, Милфорд, штат Массачусетс, США). Для измерения массы применяли масс-спектрометр Thermo Exactive Plus EMR, оснащенный источником ионов Nanospray Flex™ (Thermo Fisher Scientific, Бремен, Германия). Перед вводом образца колонку (Waters BEH200 SEC 4,6 × 300 мм, 200Å, 1,7 мкм или Sepax Zenix SEC-300 4,6 × 300 мм, 300Å, 3 мкм) предварительно уравнивали при скорости потока 0,2 мл/мин, применяя подвижную фазу на основе ацетата аммония и бикарбоната аммония различной концентрации (от 30 мМ до 450 мМ). Это было достигнуто за счет цикла с фиксированным процентным содержанием подвижной фазы В с применением двойной системы растворителей (подвижная фаза А: вода; подвижная фаза В: 420 мМ ацетата аммония и 30 мМ бикарбоната аммония). После введения образца антитела (2-10 мкг), в течение 24 минут выполняли изократическое элюирование. С целью обеспечения одновременного УФ- и MS-обнаружения, после SEC-разделения был применен послеколоночный сплиттер (соотношение ~ 200:1), чтобы уменьшить поток до ~ 1 мкл/мин для анализа нано-ESI-MS, при этом отклоняя оставшийся высокий поток к PDA детектору для УФ-мониторинга при 280 нм. Для достижения нано-ESI применяли

одноразовый излучатель PicoTip (без покрытия, наконечник: 10 ± 1 мкм) (New Objective, Inc., Уоберн, штат Массачусетс, США). Для масс-спектрометрического анализа разрешение было установлено на 17 500, напряжение капиллярного распыления - на 1,5 кВ, энергия фрагментации в источнике - на 100, энергия столкновения - на 10, температура капилляра - на 350 °С, RF-уровень S-линзы - на 200, а HCD давление захваченного газа - на 3. Масс-спектры были получены с окном диапазона m/z от 2000 до 15000.

Пример 1. Вторичные взаимодействия в ходе SEC с применением MS-совместимого буфера.

[191] Поверхность белка является высоко гетерогенной и состоит из множества различных функциональных групп, которые могут способствовать образованию водородных связей (гидроксильные, аминные и амидные группы), электростатическим (заряженные группы) и гидрофобным (гидрофобные группы) взаимодействиям с матрицей колонки SEC на основе диоксида кремния или полисахаридов. Эти взаимодействия, как правило, имеют разную силу связывания и существенно зависят от параметров pH, температуры и состава подвижной фазы, применяемых в SEC. Например, при проведении анализа при pH, близком к нейтральному, силанольные группы из колонки SEC на основе диоксида кремния могут быть заряжены отрицательно и, следовательно, способствовать электростатическому взаимодействию с основными белками. Для подавления такого взаимодействия, в прошлом часто требовались подвижные фазы с умеренной ионной силой (Goyon et al, 2018, см. выше) или низким pH (менее 5) (Pavon et al, 2016, см. выше).

[192] Совсем недавно, посредством дериватизации поверхности диоксида кремния (например, коротких алкильных цепей или связи функциональных групп), появилась возможность эффективно экранировать остаточные силанольные группы из современной колонки SEC, что, следовательно, резко уменьшает наличие электростатических взаимодействий. Однако эти недавно введенные химические группы могут также привести к другим усиленным вторичным взаимодействиям (например, гидрофобному взаимодействию) с анализируемым белком, как сообщалось в недавних исследованиях (Yang et al, 2015, supra; Yan He et al., *On-line coupling of size exclusion chromatography with mixed-mode liquid chromatography for comprehensive profiling of biopharmaceutical drug product*, 1262 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 122-129 (2012)). Согласно Arakawa et al., электростатические взаимодействия преобладают при низких концентрациях солей, тогда как гидрофобные взаимодействия предпочтительны для подвижных фаз с высокой ионной силой, особенно при применении солей более высокого ранга в серии Хофмайстера (см. Фиг. 3). Хотя выбор солей, совместимых с применением онлайн SEC-MS, обычно ограничен (например, формиат аммония, ацетат аммония и бикарбонат аммония), различные типы вторичных взаимодействий между анализируемыми белками и матрицей колонки могут все же модулироваться путем изменения концентраций солей и исследоваться с целью разделения белков.

[193] Для оценки взаимодействий со смешанным режимом, ассоциированных с

концентрацией соли, смесь восьми антител (подклассы IgG1 и IgG4) с различными характеристиками поверхности анализировали на колонке Waters BEH200 SEC с применением подвижных фаз на основе ацетата аммония и бикарбоната аммония различной концентрации в диапазоне от 30 мМ до 300 мМ, приемлемом для последующего анализа посредством нативной MS. Молярное соотношение между ацетатом аммония и бикарбонатом аммония поддерживали постоянным на уровне 14:1 для достижения значения pH около 7,4. Хроматографическое поведение восьми mAb было проиллюстрировано нанесением на график значений их времени удерживания SEC, что определяли с помощью хроматограмм экстрагированных ионов (XIC), в зависимости от концентрации подвижной фазы (Фиг. 5). В целом, восемь mAb были наиболее хорошо разделены при выполнении SEC с применением концентрации соли подвижной фазы 30 мМ. По мере увеличения концентрации соли, профили элюирования восьми mAb становились более конвергированными и менее разделенными (вставки на Фиг. 5). Эти сдвиги во времени удерживания можно объяснить изменениями вторичных взаимодействий между молекулой mAb и матрицей колонки. С одной стороны, когда остаточные силанольные группы из матрицы колонки становились отрицательно заряженными при pH 7,4, они могли взаимодействовать с положительно заряженной поверхностью белка посредством электростатического взаимодействия. Это взаимодействие усиливалось при применении более низкой концентрации соли. С другой стороны, гидрофобное взаимодействие между молекулой mAb и матрицей колонки может быть усилено при применении более высоких концентраций соли. Представляет интерес тот факт, что на основании значений pI эти восемь mAb можно разделить на три разные группы, в которых наблюдались аналогичные отношения между временем удерживания и концентрацией соли. Первая группа включает три кислых молекулы mAb, mAb5 (pI=6,3), mAb6 (pI=6,4) и mAb1 (pI=6,7), которые, как ожидается, будут нести меньше положительных зарядов на поверхности белка при pH 7,4 и, следовательно, демонстрируют наименьшее электростатическое взаимодействие с матрицей колонки. Как продемонстрировано на Фиг. 5, все эти три молекулы показали тенденцию к увеличению времени удерживания по мере увеличения концентрации соли, что указывает на то, что, поскольку слабые электростатические взаимодействия устраняются при более высокой ионной силе, гидрофобное взаимодействие играет доминирующую роль во время SEC разделения. Напротив, три основные молекулы mAb, mAb3 (pI=8,0), mAb4 (pI=8,3) и mAb8 (pI=7,6), которые, как ожидается, будут нести больше положительных зарядов на поверхности белка при pH 7,4, все показали тенденцию к уменьшению времени удерживания по мере увеличения концентрации соли. Эта обратная корреляция между концентрацией соли и временем удерживания в основном объясняется доминирующим электростатическим взаимодействием, которое усиливается при низкой концентрации соли и подавляется при высокой концентрации соли. Наконец, в отличие от кислотных или основных mAb, mAb2 (pI=7,3) и mAb7 (pI=6,9) представляют собой «нейтральную» группу, которая, вероятно, несет умеренное количество положительных зарядов на

поверхности белка и, следовательно, демонстрирует средний уровень электростатических взаимодействий с матрицей колонки. Эта группа молекул сохраняла относительно неизменное время удерживания при различных концентрациях соли (от 30 мМ до 300 мМ). В этом случае, когда концентрация соли увеличивалась, увеличение гидрофобного взаимодействия, вероятно, было близко к уменьшению электростатического взаимодействия и противодействовало ему, что приводило к небольшому сдвигу во времени удерживания. Эти результаты продемонстрировали, что, правильно модулируя концентрации солей, можно разделить или частично разделить различные антитела (например, bsAb по сравнению с гомодимерами), используя взаимодействия со смешанным режимом на колонке SEC для последующего анализа MS.

[194] Хотя представляется, что большее хроматографическое разрешение было достигнуто при низких концентрациях соли на колонке Waters BEH, следует соблюдать осторожность в отношении основных mAb, поскольку в этих условиях может происходить сильное расширение пика, что может значительно повлиять на извлечение белка (Alexandre Goyon et al., *Characterization of 30 therapeutic antibodies and related products by size exclusion chromatography: Feasibility assessment for future mass spectrometry hyphenation*, 1065-1066 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 35-43 (2017)).

[195] Пример 2. Обнаружение O-гликанового варианта биспецифического антитела, биспецифического Ab с помощью MM-SEC-MS.

[196] 2.1 Приготовление образцов биспецифических антител

[197] Биспецифическое антитело к CD20xCD3 (BsAb1) представляет собой стабилизированное шарниром биспецифическое полноразмерное антитело к CD20xCD3 (Ab) на основе изотипа IgG4, модифицированного для снижения связывания Fc. Указанное антитело предназначено для связывания T-клеток (посредством CD3) и клеток, экспрессирующих CD20. Биспецифические антитела получали, следуя методике, описанной Smith et al. (Sci. Rep. (2015) 5:17943).

[198] 2.2 MM-SEC-MS

[199] Анализ с помощью MM-SEC-MS выполняли изократически с применением колонки Zenix SEC-300 МК (7,8 × 300 нм, 3 мкм) в системе, как описано выше. Элюирование контролировали УФ-излучением при 280 нм.

[200] Были проведены две серии экспериментов. В первом эксперименте подвижная фаза содержала 140 мМ ацетата аммония и 10 мМ бикарбоната аммония, а во втором эксперименте подвижная фаза содержала 420 мМ ацетат аммония и 30 мМ бикарбонат аммония. Элюирование проводили при скорости потока 0,4 мл/мин. Уравновешивание осуществляли с применением подвижной фазы.

[201] Для аналитических циклов, вводимые загрузки включали 100 мкг общего белка. Элюирование проводили с применением изократического градиента, состоящего из ацетата аммония (буфер А) и бикарбоната аммония (буфер В). Данные масс-спектрометрии анализировали с помощью программного обеспечения Intact от Protein Metrics.

[202] Два цикла с подвижными фазами разной концентрации продемонстрировали, что более высокая концентрация соли может усиливать гидрофобное взаимодействие во время SEC разделения, что наблюдается по времени элюирования биспецифического антитела в различных подвижных фазах. Этот эффект привел к увеличению разделения между биспецифическим антителом и его O-гликановым вариантом (см. Фиг. 6).

[203] Пример 3. Обнаружение гомодимерных видов с помощью Zenix SEC-300, 3 мкм, 300 Å, 7,8 × 300 мм.

[204] 3.1 Приготовление образцов стандартов смеси биспецифических антител и гомодимеров

[205] Две гомодимерные примеси образуются в ходе продукции биспецифического антитела (BsAb1) (Fc*/Fc): гомодимер 1 (Fc*-Fc*) и гомодимер 2 (Fc/Fc) (см. Фиг. 2).

[206] 3.2 MM-SEC-MS

[207] Анализ с помощью MM-SEC-MS выполняли изократически с применением колонки Zenix SEC-300 МК (7,8 × 300 нм, 3 мкм) в системе, как описано выше. Элюирование контролировали УФ-излучением при 280 нм.

[208] Были проведены две серии экспериментов. В первом эксперименте подвижная фаза содержала 140 мМ ацетата аммония и 10 мМ бикарбоната аммония, а во втором эксперименте подвижная фаза содержала 420 мМ ацетат аммония и 30 мМ бикарбонат аммония. Элюирование проводили при скорости потока 0,4 мл/мин.

[209] Для аналитических циклов, вводимые загрузки включали 50 мкг общего белка. Элюирование проводили с применением изократического градиента, состоящего из ацетата аммония (буфер А) и бикарбоната аммония (буфер В). Аналогично результатам, полученным в 2.2, два цикла с подвижными фазами разной концентрации продемонстрировали, что более высокая концентрация соли может усиливать гидрофобное взаимодействие во время SEC разделения, что наблюдается по времени элюирования биспецифического антитела и гомодимеров в различных подвижных фазах. Подвижная фаза с общей концентрацией соли 450 мМ улучшала отделение гомодимера 1 и гомодимера 2 от биспецифического антитела (см. Фиг. 7).

[210] Пример 4. Сравнение обнаружения гомодимерных примесей в биспецифическом антителе с помощью MM-SEC-MS, SEC-MS и RP LC-MS.

[211] 4.1 Приготовление образцов стандартов смеси биспецифических антител и гомодимеров

[212] Образец готовили по методике, проиллюстрированной в примере 3.

[213] 4.2 RP LC-MS

[214] Образец разбавляли до 0,5 мг/мл. Этот раствор вводили в количестве 0,5 мкг для анализа LC-MS. Эксперимент LC - MS проводили на масс-спектрометре ThermoFisher Fusion Lumos Tribrid. Колонку Waters BioResolve™ mAb Polyphenyl, 450 Å, 2,7 мкм, 2,1 × 50 мм (O.N. 186008944) применяли для разделения с обращенной фазой. Температура образца устанавливали на 5 °С, а температура колонки - на 80 °С. Подвижная фаза А представляет собой 0,1% FA в воде, подвижная фаза В - 0,1% FA в ацетонитриле. Масс-

спектрометрический эксперимент проводился в положительном режиме. Условия источника ионов MS устанавливали следующим образом: напряжение распыления 3,8 кВ, температура трубки переноса ионов 325 °С, температура испарителя 250 °С, защитный газ 40 (Arb), вспомогательный газ 10 (Arb), продувочный газ 2 (Arb), линза RF (%) 60 и энергия фрагментации источника 40 В. Данные MS получали с помощью орбитальной ловушки в режиме большого диапазона масс с диапазоном m/z от 1500 до 4000. Разрешение устанавливали на 15000 при m/z 200 с 10 микросканированиями, AGC цель была 10^5 , максимальное время введения составляло 50 мс. Данные масс-спектрометрии анализировали с помощью программного обеспечения Xcalibur.

[215] 4.3 SEC-MS

[216] Эксклюзионную хроматографию (SEC) выполняли на колонке ACQUITY UPLC Protein BEH SEC (200 Å, 1,7 мкм, 4,6 мм × 300 мм) с применением подвижной фазы, содержащей 140 мМ ацетата аммония и 10 мМ бикарбоната аммония. Эксперименты SEC проводили на системе Waters Acquity UPLC I-класса при комнатной температуре, с детектированием длины волны при 280 нм, скоростью потока 0,2 мл/мин и вводимой нагрузкой белка 50 мкг.

[217] 4.4 MM-SEC-MS

[218] Аналитический цикл на системе MM-SEC-MS проводили изократически с применением подвижной фазы, содержащей 420 мМ ацетата аммония и 30 мМ бикарбоната аммония по методике, проиллюстрированной в Примере 3.2.

[219] 4.5. Результаты

[220] Сравнение общей ионной хроматограммы (TIC) и спектров нативной MS для RP LC-MS на Lumos (см. Фиг. 8), SEC-MS на EMR и MM-SEC-MS на EMR демонстрирует существенное отделение и обнаружение гомодимеров от биспецифического антитела. Исходная масс-спектрограмма, полученная при помощи RP LC-MS, не позволяла дифференцировать гомодимеры и биспецифическое антитело. Необработанный масс-спектр от SEC-MS позволил разделить и обнаружить гомодимер 1 и биспецифическое антитело, но разделения было недостаточно для разделения и обнаружения гомодимера 2 и биспецифического антитела. Только необработанные масс-спектры из MM-SEC-MS продемонстрировали достаточное разделение и обнаружение гомодимера 1, гомодимера 2 и биспецифического антитела. Это сравнение подтверждает концепцию преимущества MM-SEC-MS над SEC-MS и RP LC-MS для обнаружения примесей в биофармацевтических продуктах.

[221] Пример 5. Последовательные циклы MM-SEC-MS обнаружения с помощью Zenix SEC-300, 3 мкм, 300 Å, 7,8 × 300 мм

[222] Для оценки качества данных обнаружения в последовательных циклах с помощью системы MM-SEC-MS было проведено три аналитических цикла для образца, содержащего биспецифическое Ab, гомодимер 1 и гомодимер 2 (приготовленные, как описано в разделе 4.1). Аналитические циклы выполняли по методологии, проиллюстрированной в разделе 4.2, и с подвижной фазой, содержащей 280 мМ ацетата

аммония и 20 мМ бикарбоната аммония.

[223] Необработанные масс-спектры и хроматограмма извлеченных ионов (ХИС) для трех циклов продемонстрировали снижение качества данных и отношения «сигнал/шум» (см. Фиг. 9). Этот эффект может наблюдаться из-за применения большой колонки ($7,8 \times 300$ мм), для которой требуется большое количество образца белка (~ 50 мкг) для обеспечения интенсивности MS, что может привести к осаждению белка при высокой концентрации соли и, следовательно, требуется более частая очистка пути прохождения потока (перед очисткой запускают максимум 3 образца).

[224] Кроме того, большая колонка и относительно низкая скорость потока, с которой может работать наноразделитель (макс ~ 0,4 мл/мин), приводили к большой ширине пика (~ 1,5 мин), что в некоторых случаях влияло на MS интенсивность и разрешение. Время позднего элюирования также замедляло общее время анализа (30 мин для каждого образца).

[225] Пример 6. Обнаружение гомодимерных видов с помощью Zenix SEC-300, 3 мкм, 300 Å, $4,6 \times 300$ мм.

[226] 6.1 Приготовление образцов стандартов смеси биспецифических антител и гомодимеров

[227] Стандарты смеси биспецифических антител и гомодимеров можно получить согласно способов, описанных в разделе 3.1.

[228] 6.2 MM-SEC-MS

[229] Анализ с помощью MM-SEC-MS выполняли изократически с применением колонки Zenix SEC-300 МК ($4,6 \times 300$ мм, 3 мкм) в системе, как описано выше. Элюирование контролировали УФ-излучением при 280 нм.

[230] Были проведены четыре серии экспериментов. В первом эксперименте, подвижная фаза содержала 140 мМ ацетата аммония и 10 мМ бикарбоната аммония, во втором эксперименте подвижная фаза содержала 280 мМ ацетата аммония и 20 мМ бикарбоната аммония, в третьем эксперименте подвижная фаза содержала 420 мМ ацетата аммония и 30 мМ бикарбоната аммония, и во втором эксперименте подвижная фаза содержала 560 мМ ацетат аммония и 40 мМ бикарбоната аммония. Элюирование проводили при скорости потока 0,3 мл/мин.

[231] Для аналитических циклов, вводимые загрузки включали 10 мкг белка. Элюирование проводили с применением изократического градиента, состоящего из ацетата аммония (буфер А) и бикарбоната аммония (буфер В). Применение концентраций более 150 мМ общей концентрации соли демонстрировало улучшенное разделение и обнаружение гомодимеров и биспецифических антител (см. Фиг. 10). Общее время анализа при применении меньшей колонки ($4,6 \times 300$ мм) уменьшилось до около 18 минут, а ширина пика уменьшилась до менее чем 1 минуты по сравнению с общим временем анализа и шириной пика при применении большей колонки ($7,8 \times 300$ мм). Различия приведены на Фиг. 11

[232] Пример 7. Анализ MM-SEC-MS дегликозилированной смеси

биспецифических антител, гомодимера 1 и гомодимера 2 на колонке Zenix-SEC.

[233] 7.1 Приготовление дегликозилированной смеси биспецифических антител, гомодимера 1 и гомодимера 2

[234] Каждый белок обрабатывали пептидом N-гликозидазой F (ПНГаза F; 1 IUB миллиединица на 10 мкг белка) при 45°C в течение 1 часа для полного удаления гликановых цепей из каждой константной области тяжелой цепи.

[235] 7.2 MM-SEC-MS

[236] Анализ с помощью MM-SEC-MS выполняли изократически с применением колонки Zenix SEC-300 МК (4,6 × 300 нм, 3 мкм) в системе, как описано выше. Элюирование контролировали УФ-излучением при 280 нм.

[237] Были проведены шесть серий экспериментов. В первом эксперименте подвижная фаза содержала 9,3 мМ ацетата аммония и 0,7 мМ бикарбоната аммония, во втором эксперименте подвижная фаза содержала 46,7 мМ ацетата аммония и 3,3 мМ бикарбоната аммония, в третьем эксперименте подвижная фаза содержала 93,3 мМ ацетата аммония и 6,7 мМ бикарбоната аммония, в четвертом эксперименте подвижная фаза содержала 186,7 мМ ацетата аммония и 13,3 мМ бикарбоната аммония, в пятом эксперименте подвижная фаза содержала 280 мМ ацетата аммония и 20 мМ бикарбоната аммония, и в шестом эксперименте подвижная фаза содержала 420 мМ ацетата аммония и 30 мМ бикарбоната аммония. Элюирование проводили при скорости потока 0,3 мл/мин.

[238] Для аналитических циклов, вводимые загрузки включали 10 мкг белка.

[239] Применение общей концентрации соли 10 мМ демонстрировало существенное разделение гомодимера 1, биспецифического антитела и гомодимера 2. При концентрации соли 10 мМ гомодимер 2 имел более позднее время удерживания, чем биспецифическое антитело, которое демонстрировало более позднее время удерживания, чем гомодимер 1. Однако при концентрациях более 10 мМ гомодимер 1 имел более позднее время удерживания, чем биспецифическое антитело, которое демонстрировало более низкое время удерживания, чем гомодимер 2 (см. Фиг. 12 и Фиг. 13). Этот эффект может быть связан с различным типом взаимодействия: зарядом, формой или гидрофобностью трех белков с использованной смолой для эксклюзионной хроматографии. Заряд белка при данной концентрации соли зависит от их значений pI (Таблица 2). Существенные разделения получали либо при применении подвижной фазы с низкой концентрацией соли 10 мМ, либо при применении подвижной фазы с высокой концентрацией соли более 100 мМ. При более низких концентрациях соли удерживание может быть вызвано взаимодействием «заряд-заряд». Например, основные молекулы можно разделить с помощью подвижной фазы с более низкой концентрацией соли в системе MM-SEC-MS. При более высоких концентрациях соли удерживание происходит за счет гидрофобного взаимодействия. Например, кислотные или гидрофобные молекулы могут быть разделены с применением подвижной фазы с более высокой концентрацией соли в системе MM-SEC-MS (см. Фиг. 14 и фиг. 15).

[240] Идеальное SEC разделение должно основываться только на

гидродинамическом объеме белка, и не должно быть никакого другого взаимодействия между белком и неподвижной фазой. Поскольку матрица колонки на основе диоксида кремния может демонстрировать отрицательные заряды из-за силанольных групп (ионообменные характеристики), дериватизация частиц диоксида кремния помогает уменьшить эффект силанола, но в то же время может ввести новый механизм взаимодействия (гидрофобность). Таким образом, можно создавать смолы SEC, обладающие функциональными возможностями, как это было видно с колонками Zenix SEC. Это объясняет разницу в порядке элюирования белков с разными концентрациями при применении колонки Zenix-SEC.

Таблица 2.

mAb	pI	Молекулярная масса
Биспецифическое антитело	7,66	145 337
Гомодимер 1 (биспецифическое антитело HC* гомодимер)	8,03	144 677
Гомодимер 2 (биспецифическое антитело HC гомодимер)	7,28	145 998

Пример 8. Анализ ММ-SEC-MS дегликозилированной смеси биспецифических антител, гомодимера 1 и гомодимера 2 на колонке Waters VEN SEC.

[241] 8.1 Приготовление дегликозилированной смеси биспецифических антител, гомодимера 1 и гомодимера 2

[242] Дегликозилированную смесь готовили по той же методике, что и разделе 7.1.

[243] 8.2 ММ-SEC-MS

[244] Анализ с помощью ММ-SEC-MS выполняли изократически с применением колонки Waters VEN SEC в системе, как описано выше. Элюирование контролировали УФ-излучением при 280 нм.

[245] Были проведены шесть серий экспериментов. В первом эксперименте подвижная фаза содержала 14 мМ ацетата аммония и 1 мМ бикарбоната аммония, во втором эксперименте подвижная фаза содержала 18,7 мМ ацетата аммония и 1,3 мМ бикарбоната аммония, в третьем эксперименте подвижная фаза содержала 28 мМ ацетата аммония и 2 мМ бикарбоната аммония, в четвертом эксперименте подвижная фаза содержала 70 мМ ацетата аммония и 5 мМ бикарбоната аммония, в пятом эксперименте подвижная фаза содержала 93,3 мМ ацетата аммония и 6,7 мМ бикарбоната аммония, и в шестом эксперименте подвижная фаза содержала 280 мМ ацетата аммония и 20 мМ бикарбоната аммония. Элюирование проводили при скорости потока 0,2 мл/мин.

[246] Для аналитических циклов, вводимые загрузки включали 10 мкг белка.

[247] Применение общей концентрации соли 15 мМ демонстрировало существенное разделение гомодимера 1, биспецифического антитела и гомодимера 2. При концентрации соли 15 мМ гомодимер 2 имел более раннее время удерживания, чем биспецифическое антитело, которое демонстрировало более раннее время удерживания,

чем гомодимер 1. При увеличении концентрации подвижной фазы различия во временах удерживания уменьшались. Кроме того, при концентрации соли в подвижной фазе 300 мМ гомодимер 1 имел более раннее время удерживания, чем биспецифическое антитело, которое демонстрировало более раннее время удерживания, чем гомодимер 2 (см. Фиг. 16 и Фиг. 17). Как продемонстрировано на Фиг. 14 и Фиг. 15, этот эффект связан с развитием дополнительного взаимодействия на колонке SEC. Дополнительное взаимодействие зависит от концентрации соли в подвижной фазе. При более низких концентрациях, взаимодействия «заряд-заряд» преобладают в колонке и определяют удерживание белков на колонке.

[248] Пример 9. MM-SEC-MS анализ молекулы IgG1 и ее окисленного варианта на колонке Waters VEN SEC.

[249] 9.1 Приготовление окисленного варианта молекулы IgG1 - Ab1

[250] Ab1 обрабатывали пептидом N-гликозидазой F (ПНГаза F; 1 IUB миллиединица на 10 мкг белка) при 45°C в течение 1 часа для полного удаления гликановых цепей из каждой константной области тяжелой цепи.

[251] 9.2 MM-SEC-MS

[252] Анализ с помощью MM-SEC-MS выполняли изократически с применением колонки Waters VEN SEC в системе, как описано выше. Элюирование контролировали УФ-излучением при 280 нм.

[253] Были проведены три серии экспериментов. В первом эксперименте подвижная фаза содержала 93,3 мМ ацетата аммония и 6,7 мМ бикарбоната аммония, во втором эксперименте подвижная фаза содержала 140 мМ ацетата аммония и 10 мМ бикарбоната аммония, а в третьем эксперименте, шестом эксперименте, подвижная фаза содержала 280 мМ ацетата аммония и 20 мМ бикарбоната аммония. Элюирование проводили при скорости потока 0,2 мл/мин.

[254] Для аналитических циклов, вводимые загрузки включали 10 мкг белка.

[255] Отмечалось существенное разделение антитела Ab1 и его окисленного варианта в системе MM-SEC-MS при применении концентрации соли в подвижной фазе 100 мМ, 150 мМ и 300 мМ (см. Фиг. 18, верхняя панель). Значение pI антитела IgG1 Ab1 составляло 8,65. Для молекул IgG1 с более высоким pI зарядовое взаимодействие играло более доминирующую роль по сравнению с молекулами IgG4, которые имеют низкие значения pI.

[256] Пример 10. MM-SEC-MS анализ молекулы IgG1 на колонке Waters VEN SEC

[257] 10.1 Приготовление молекулы IgG1 - Ab2

[258] Ab2 обрабатывали пептидом N-гликозидазой F (ПНГаза F; 1 IUB миллиединица на 10 мкг белка) при 45°C в течение 1 часа для полного удаления гликановых цепей из каждой константной области тяжелой цепи.

[259] 10.2 MM-SEC-MS

[260] Анализ с помощью MM-SEC-MS выполняли изократически с применением колонки Waters VEN SEC в системе, как описано в Примере 8.2. При сравнении времени

удерживания двух молекул IgG1: Ab1 и Ab2, было замечено, что молекула Ab2 имела более низкое время удерживания (см. Фиг. 18, нижняя панель).

[261] Это можно объяснить разницей в гидрофобности между Ab1 и Ab2. Для более гидрофобных молекул эффект «высаливания» начинает проявляться при более низкой концентрации соли по сравнению с менее гидрофобными молекулами. Эта точка также называется точкой перехода (см. Фиг. 19).

[262] Пример 11. Количественное определение гомодимерных примесей в биспецифических антителах с помощью ММ-SEC-MS

[263] Стандарты генерировали по методологии, приведенной на Фиг. 20.

[264] Анализ с помощью ММ-SEC-MS выполняли изократически с применением колонки Zenix SEC-300 МК ($4,6 \times 300$ нм, 3 мкм) в системе, как описано выше. Для элюирования белков применяли подвижные фазы с концентрацией соли 300 мМ и концентрацией соли 70 мМ. Как для концентраций на интактном, так и субъединичном уровне, более высокое обнаружение с помощью ММ-SEC-MS наблюдали в образцах с большим количеством гомодимеров (см. Фиг. 21 и Фиг. 22). При концентрации соли 70 мМ для подвижной фазы, также была обнаружена дополнительная Fc примесь биспецифического антитела.

[265] На интактном уровне, график теоретического соотношения «гомодимер 1/биспецифическое антитело» по сравнению с обнаруженным соотношением «гомодимер 1/биспецифическое антитело» и теоретического соотношения «гомодимер 2/биспецифическое антитело» по сравнению с обнаруженным соотношением «гомодимер 2/биспецифическое антитело» продемонстрировал хорошую линейность для количественного определения присутствующих гомодимеров от 0,1% до 50% (см. Фиг. 23).

[266] На субъединичном уровне, график теоретического соотношения «гомодимер 1/биспецифическое антитело» по сравнению с обнаруженным соотношением «гомодимер 1/биспецифическое антитело» и график теоретического соотношения «гомодимер 2/биспецифическое антитело» по сравнению с обнаруженным соотношением «гомодимер 2/биспецифическое антитело» продемонстрировал хорошую линейность для количественного определения присутствующих гомодимеров от 0,1% до 50% (см. Фиг. 24). По сравнению с интактным уровнем, лучшая точность была получена на субъединичном уровне.

[267] Пример 12. Разделение SEC в смешанном режиме биспецифических и гомодимерных антител для обнаружения нативной MS.

[268] Четыре молекулы bsAb с разными значениями pI и гидрофобностью (Таблица 3) смешивали с соответствующими гомодимерными антителами и применяли в качестве стандартов тестирования. Каждая молекула bsAb (H₁H₂L₂) содержала две идентичные легкие цепи (LC) и две разные тяжелые цепи (HC и HC*), тогда как каждое гомодимерное антитело (H₂L₂ или H₁H₂L₂) содержало две идентичные легкие цепи и две идентичные тяжелые цепи (HC или HC*).

Таблица 3.

		pI	Гидрофобность (кажущийся фактор удерживания НИС*; мин)
bsAb2 смесь	bsAb2 (НН*L2)	6,5	5,2
	НС гомодимер (H2L2)	6,1	4,3
	НС* гомодимер (H*2L2)	7,2	6,1
bsAb3 смесь	bsAb3 (НН*L2)	7,4	4,8
	НС гомодимер (H2L2)	6,6	4,2
	НС* гомодимер (H*2L2)	8,3	5,6
bsAb4 смесь	bsAb4 (НН*L2)	7,7	7,0
	НС гомодимер (H2L2)	7,3	8,4
	НС* гомодимер (H*2L2)	8,0	5,7
bsAb5 смесь	bsAb5 (НН*L2)	8,1	6,3
	НС гомодимер (H2L2)	7,4	5,2
	НС* гомодимер (H*2L2)	8,5	7,7

* Кажущийся фактор удерживания НИС рассчитывали на основании времени удерживания молекулы белка, проанализированного с помощью НИС. На колонку УМС BioPro НИС ВF (4 мкм, 100 мм × 4,6 мм) наносили подвижную фазу «А» из 3,3 М аммонийного буфера и подвижную фазу В воды. Градиент выполняли от 100% до 97% А за 18 мин при скорости потока 0,4 мл/мин. Кажущийся фактор удерживания НИС рассчитывали путем нормализации времени удерживания в течение 18 минут по шкале 10.

[269] Затем четыре смеси bsAb анализировали на колонке Waters ВЕН с применением трех различных концентраций соли (75 мМ, 150 мМ и 300 мМ) с последующим обнаружением с помощью онлайн нативной MS. Полученные хроматограммы основных пиков (base peak chromatogram - ВРС) продемонстрированы на левой панели Фиг. 25. В соответствии с наблюдениями из предыдущего исследования, когда концентрация соли увеличивалась, молекулы mAb с разными значениями pI демонстрировали разные тенденции времени удерживания. Учитывая различную характеристику удерживания каждого антитела при различных концентрациях соли, авторы исследовали возможность отделения гомодимеров от bsAb путем модуляции концентраций соли. Например, в смеси bsAb2, когда концентрация соли снижалась с 300 мМ до 75 мМ, две кислые молекулы, гомодимер H2L2 (pI=6,1) и НН*L2 bsAb (pI=6,5), элюировались раньше, вероятно, из-за снижения гидрофобных и электростатических взаимодействий при низкой концентрации соли. Напротив, нейтральная молекула, гомодимер H*2L2 (pI=7,2), оставалась почти неизменной во времени удерживания при изменении концентрации соли, предположительно из-за того, что уменьшенному гидрофобному взаимодействию противодействовало усиленное электростатическое

взаимодействие при низкой концентрации соли. Кроме того, поскольку гомодимер H2L2 продемонстрировал более значительное уменьшение времени удерживания по сравнению с НН*L2 bsAb (возможно, из-за его более низкого значения pI и, следовательно, более слабого электростатического взаимодействия), улучшенное разделение между ними было также достигнуто при более низкой концентрации соли. В результате хорошее хроматографическое разделение между гомодимерами и bsAb2 было достигнуто при концентрации соли 75 мМ.

[270] Точно так же разделение между bsAb3 и двумя его гомодимерами также значительно улучшилось, когда концентрация соли снизилась с 300 мМ до 75 мМ. Это связано с тем, что показатели времени удерживания гомодимера H2L2 (pI=6,6), НН*L2 bsAb (pI=7,4) и гомодимера Н*2L2 (pI=8,3) уменьшились, остались неизменными или увеличились, соответственно. Примечательно, что хотя исходное разрешение не было достигнуто ни для одного из двух примеров, на идентификацию и количественное определение гомодимеров не должны оказывать существенное влияние коэлюирующие частицы, как это было бы для количественного определения на основе УФ-излучения из-за высокой специфичности MS как детектора.

[271] В смеси bsAb5, лучшее разделение снова было достигнуто при концентрации соли 75 мМ на колонке ВЕН по сравнению с условиями с высоким содержанием соли. Это связано с тем, что относительно основные молекулы, НН*L2 bsAb (pI=8,1) и гомодимер Н*2L2 (pI=8,5), обе продемонстрировали более позднее время удерживания, тогда как относительно нейтральный гомодимер H2L2 (pI=7,4) не продемонстрировал изменений в показателе времени удерживания при уменьшении концентрации соли. Однако, несмотря на хорошее хроматографическое разделение, это условие не было идеальным для количественного определения гомодимера, поскольку для гомодимера Н*2L2 при низкой концентрации соли из-за его высоких основных характеристик начало происходить расширение пика и снижение извлечения белка. Более того, смесь bsAb4 продемонстрировала, что улучшенное разделение не может быть достигнуто за счет снижения концентрации соли с 300 мМ до 75 мМ. Вероятно, это связано с тем, что все три молекулы имеют близкие к нейтральным значения pI (Таблица 3) и, таким образом, демонстрируют аналогичные характеристики удерживания с соответствующими изменениями концентрации соли. Хотя дальнейшее снижение концентрации соли для усиления электростатического взаимодействия может улучшить разделение, вероятно, произойдет сильное расширение пика, что нарушит количественное определение. Также представляет интерес тот факт, что профиль элюирования смеси bsAb4 расширялся с увеличением концентрации соли. При концентрации соли 300 мМ, порядок элюирования трех молекул был определен с помощью ХИС (данные не продемонстрированы) для гомодимера Н*2L2, НН*L2 bsAb и гомодимера H2L2, что соответствовало их ранжированию по гидрофобности, определенному с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (Таблица 3). Следовательно, дальнейшее усиление гидрофобного взаимодействия за счет применения еще более высокой концентрации соли,

вероятно, улучшит разделение смеси bsAb4 на этой колонке. К сожалению, исходя из нашего опыта, концентрация солей выше 300 мМ обычно создает проблему десольватации и значительно снижает чувствительность нативной MS.

[272] Для дальнейшего изучения разделения смесей bsAb при применении концентраций солей, пригодных для анализа MS, колонку Sepax Zenix SEC-300 оценивали на предмет взаимодействия в смешанном режиме. Гранулы диоксида кремния 3 мкм в этой колонке покрыты химически связанным стойким монослоем, который, вероятно, способствует умеренной гидрофобности этой колонки, как сообщалось в предыдущих исследованиях (Yang et al, 2016, выше; Wong et al, выше; Pavon et al, выше). При концентрациях соли 150 мМ и 300 мМ, каждую из четырех смесей bsAb разделяли на этой колонке для последующего детектирования нативной масс-спектрометрией; сгенерированные ВРС продемонстрированы на правых панелях Фиг. 25. Как и ожидалось, смесь bsAb4 продемонстрировала улучшенное разделение на колонке Zenix по сравнению с колонкой ВЕН при применении тех же концентраций соли. Порядок элюирования трех молекул также соответствовал их относительной гидрофобности, причем наиболее гидрофобный гомодимер H2L2 элюировался последним. Следует обратить внимание, что хроматографическое разрешение смеси bsAb4 дополнительно улучшалось при концентрации соли 300 мМ по сравнению с таковой при 150 мМ, что является ожидаемым, поскольку более высокая концентрация соли способствует гидрофобному взаимодействию. Кроме того, смесь bsAb5 более эффективно разделялась на колонке Zenix по сравнению с колонкой ВЕН, предположительно из-за больших различий в гидрофобном взаимодействии с матрицей колонки между компонентами смеси. Таким образом, модулируя концентрацию соли на двух колонках SEC с разными свойствами, мы демонстрируем, что хорошее хроматографическое разделение может быть достигнуто для всех четырех смесей bsAb при концентрациях соли, благоприятных для последующего обнаружения посредством нативной MS. Также вероятно, что другие колонки SEC, не протестированные в этом исследовании, могут еще больше расширить применимость этого способа, предлагая новые взаимодействия в смешанном режиме.

Пример 13. Количественное определение гомодимерных примесей с помощью нативной ММ-SEC-MS.

[273] Относительное количественное определение с помощью подходов, основанных на MS, часто требует хорошо охарактеризованного понимания отклика MS (например, эффективности ионизации и эффективности передачи ионов) от каждого аналита. Из-за своего сходного размера, bsAb и гомодимеры должны демонстрировать одинаковую эффективность передачи ионов во время нативного MS-анализа. С другой стороны, на эффективность ионизации может влиять как состав растворителя во время элюирования, так и присутствие совместно элюируемых частиц. Поскольку в методе ММ-SEC-MS используется изократическое элюирование, влияние на ионизацию из-за разного состава растворителя, которое обычно наблюдается в методах градиентного элюирования (например, IEX-MS), может быть устранено. Для оценки эффективности метода ММ-SEC-

MS на предмет относительного количественного определения гомодимерных примесей, для анализа была подготовлена серия добавленных образцов bsAb₂, содержащих гомодимерные примеси в диапазоне от 0,1% до 10%. Колонку Waters ВЕН с подвижной фазой с концентрацией соли 75 мМ применяли для достижения разделения ММ-SEC между bsAb₂ и соответствующими гомодимерами. Для оценки относительного количественного определения каждого гомодимера, присутствующего в образцах bsAb₂, были сгенерированы ХИС, основанные на *m/z* четырех наиболее распространенных зарядовых состояний либо гомодимерных видов, либо bsAb₂, а площади пиков были интегрированы и использовались для количественного определения количества каждого гомодимера. Как продемонстрировано на Фиг. 26, этим методом можно легко добиться надежного количественного определения гомодимерных примесей в диапазоне от 0,1% до 10%. Кроме того, даже при добавленном 0,1% уровне все еще могут быть получены высококачественные нативные масс-спектры гомодимеров H₂L₂ и H*₂L₂ (Фиг. 27, правая панель), что приводит к идентификации и количественному определению с высокой степенью достоверности.

[274] Новый метод ММ-SEC-MS был разработан и испытан для высокочувствительного обнаружения и количественного определения гомодимерных примесей в образцах bsAb. Сначала мы исследовали взаимодействия в смешанном режиме между молекулой антитела и матрицей колонки во время SEC разделения при различных концентрациях соли. Применяя восемь различных антител с разным значением pI, было обнаружено, что при определенных условиях pH основные молекулы проявляют более сильные электростатические взаимодействия с матрицей колонки по сравнению с кислыми молекулами, и такое взаимодействие можно усилить за счет снижения концентрации соли. С другой стороны, увеличение концентрации соли во время SEC разделения может снизить электростатическое взаимодействие, одновременно способствуя гидрофобным взаимодействиям между антителом и матрицей колонки. Эти взаимодействия в смешанном режиме предоставляют уникальную возможность для разделения антител с аналогичным гидродинамическим объемом, но с разными характеристиками поверхности. Используя преимущества различных свойств колонки, хроматографическое разделение четырех смесей bsAb выполняли методом ММ-SEC с применением либо электростатического взаимодействия, либо гидрофобного взаимодействия, что легко достигалось путем регулирования концентрации солей. Мы также продемонстрировали, что достигнутое хроматографическое разделение имеет решающее значение для улучшения обнаружения гомодимерных примесей с низким содержанием с помощью последующего нативного MS-анализа. В двух примерах bsAb, гомодимерные примеси, присутствующие в количестве 0,01% (bsAb₂) и 0,1% (bsAb₄), были успешно обнаружены с помощью этого метода ММ-SEC-MS. Насколько нам известно, эта новая разработка представляет собой наиболее чувствительный метод обнаружения гомодимерных примесей в образцах bsAb. Наконец, используя серию добавленных стандартов, мы продемонстрировали, что метод ММ-SEC-MS может

обеспечить надежный количественный анализ гомодимерных примесей, присутствующих на различных уровнях. Благодаря высокой чувствительности, идентификация и количественное определение с высокой степенью достоверности могут быть достигнуты даже при таких низких уровнях, таких как 0,1%. Таким образом, этот недавно разработанный метод MM-SEC-MS обеспечивает высокочувствительный подход для обнаружения и количественного определения гомодимерных примесей в образцах bsAb и, таким образом, может применяться в поддержку разработки терапевтического bsAb. Наконец, применение этого метода может распространяться на другие области, такие как характеристика смеси антител, присутствующих в совместно составленных терапевтических средствах.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ количественного определения целевого белка и варианта белка указанного целевого белка в образце, включающий:

приведение указанного образца в контакт с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии смешанного типа с дополнительной функциональностью, которая приводит к смешанному разделению;

промывание смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, содержащего целевой белок и вариант белка; и

количественное определение целевого белка и варианта белка в указанном элюенте с помощью масс-спектрометра.

2. Способ по п.1, в котором подвижная фаза содержит ацетат аммония, бикарбонат аммония или формиат аммония, или их комбинации.

3. Способ по п.1, в котором подвижная фаза имеет общую концентрацию ацетата аммония и бикарбоната аммония менее чем приблизительно 600 мМ.

4. Способ по п.1, в котором подвижная фаза имеет скорость потока приблизительно от 0,2 мл/мин до приблизительно 0,4 мл/мин.

5. Способ по п.1, в котором количество образца, загруженного на смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом, составляет от приблизительно 10 мкг до приблизительно 100 мкг.

6. Способ по п.1, в котором целевой белок представляет собой биспецифическое антитело.

7. Способ по п.1, в котором целевой белок представляет собой терапевтическое антитело.

8. Способ по п.1, в котором масс-спектрометр соединен с хроматографической системой.

9. Способ по п.1, в котором дополнительная функциональность представляет собой функциональность гидрофобного взаимодействия.

10. Способ по п.1, в котором дополнительная функциональность представляет собой функциональность взаимодействия «заряд-заряд».

11. Способ по п.1, в котором масс-спектрометр представляет собой нативный масс-спектрометр.

12. Способ обнаружения целевого белка в образце, включающий:

приведение указанного образца в контакт с хроматографической системой, содержащей смолу для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с дополнительной функциональностью, которая приводит к смешанному разделению;

промывание смолы для эксклюзионной хроматографии со смешанным режимом с применением подвижной фазы для получения элюента, содержащего целевой белок; и обнаружение целевого белка в указанном элюенте с помощью масс-спектрометра.

13. Способ по п.12, в котором подвижная фаза, используемая для элюирования целевого белка, содержит ацетат аммония, бикарбонат аммония или формиат аммония, или их комбинации.

14. Способ по п.12, в котором подвижная фаза, используемая для элюирования целевого белка, имеет общую концентрацию ацетата аммония и бикарбоната аммония менее чем приблизительно 600 мМ.

15. Способ по п.12, в котором масс-спектрометр соединен с хроматографической системой.

16. Способ по п.12, в котором дополнительная функциональность представляет собой функциональность гидрофобного взаимодействия.

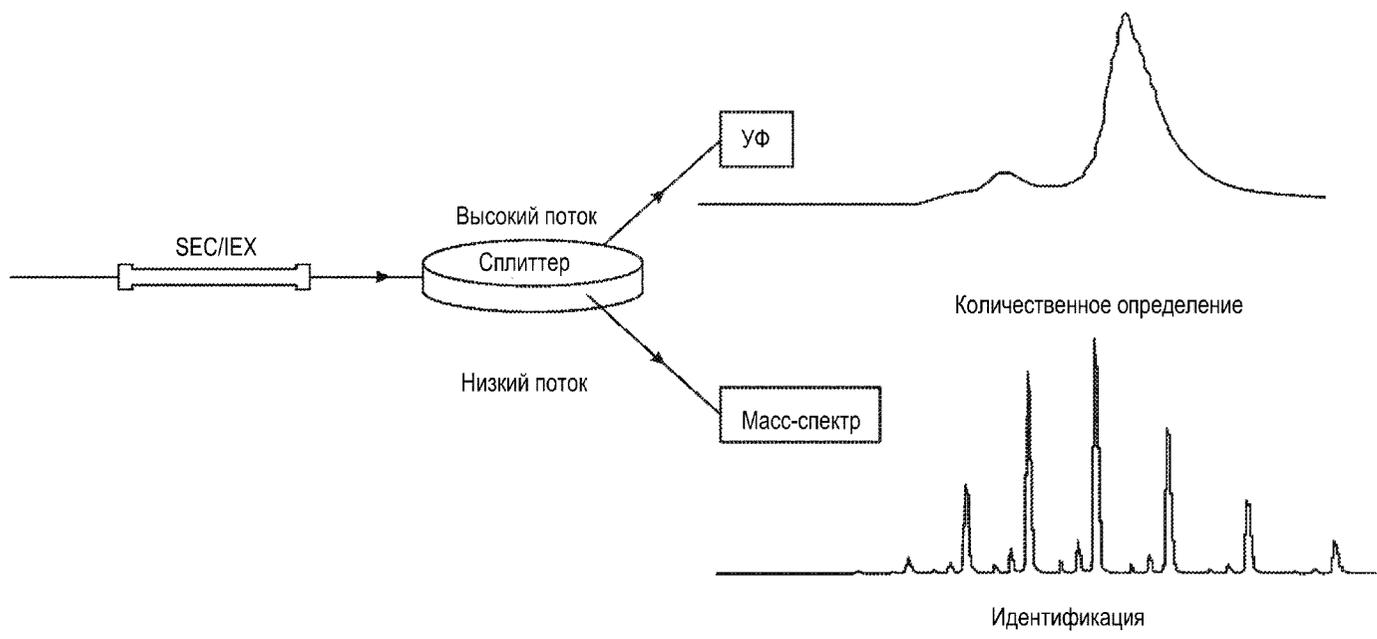
17. Способ по п.12, в котором дополнительная функциональность представляет собой функциональность взаимодействия «заряд-заряд».

18. Способ по п.12, в котором масс-спектрометр представляет собой нативный масс-спектрометр.

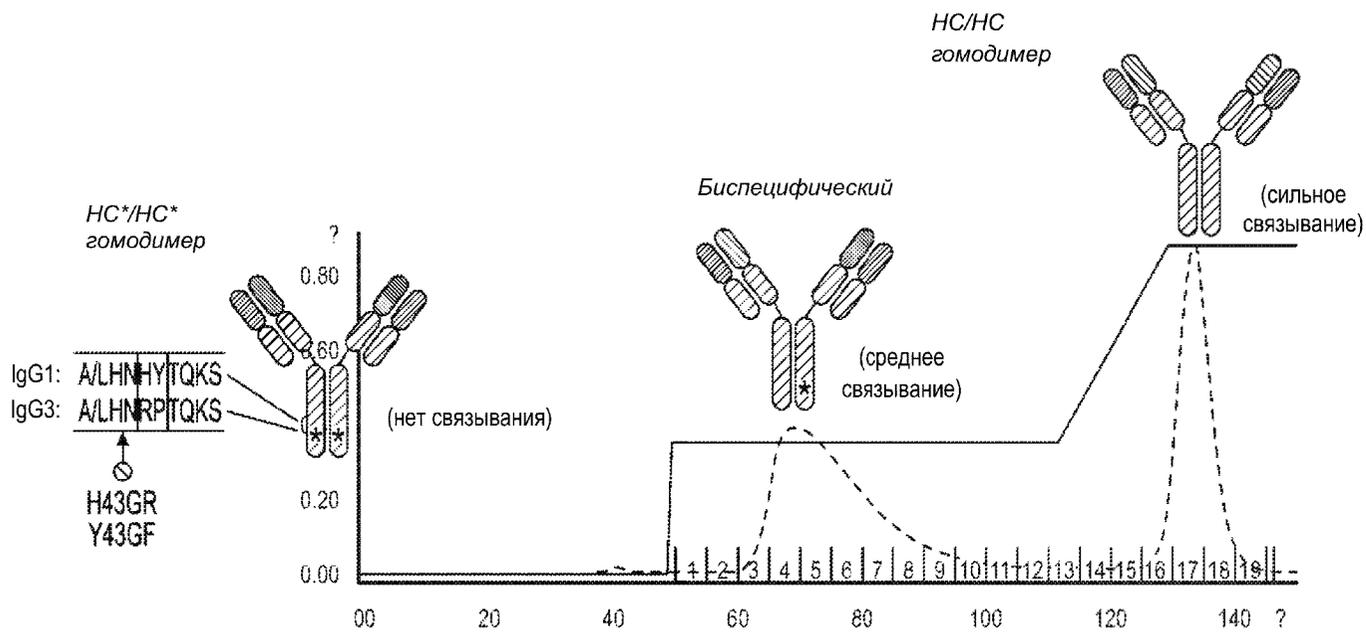
19. Способ по п.12, где целевой белок представляет собой биспецифическое антитело.

20. Способ по п.12, где целевой белок представляет собой терапевтическое антитело.

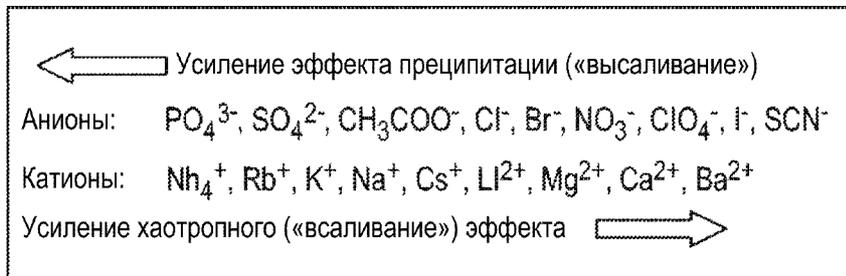
По доверенности



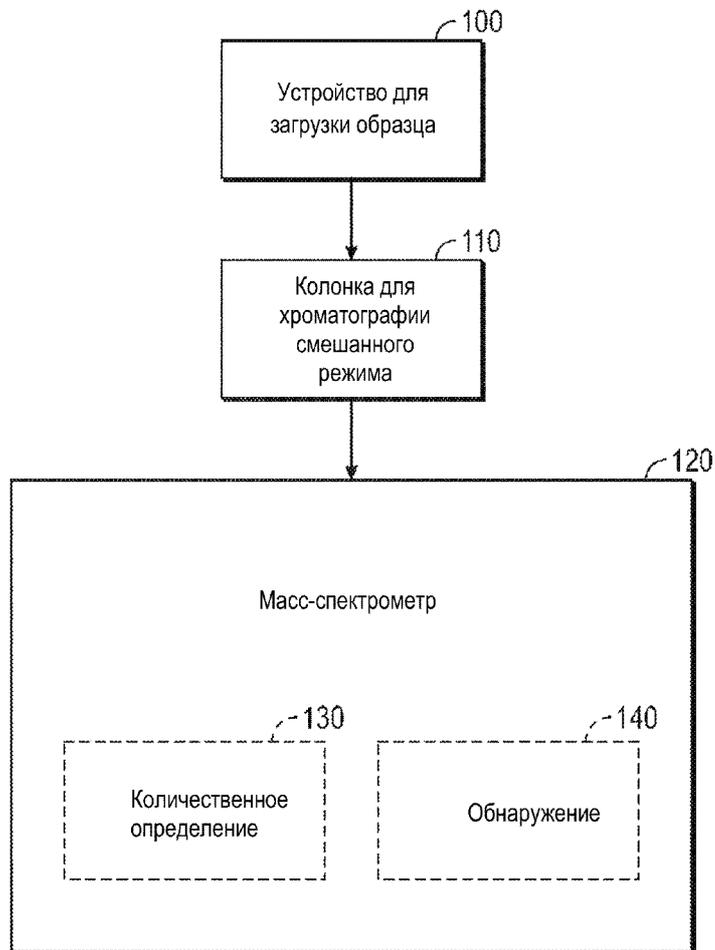
Фиг. 1



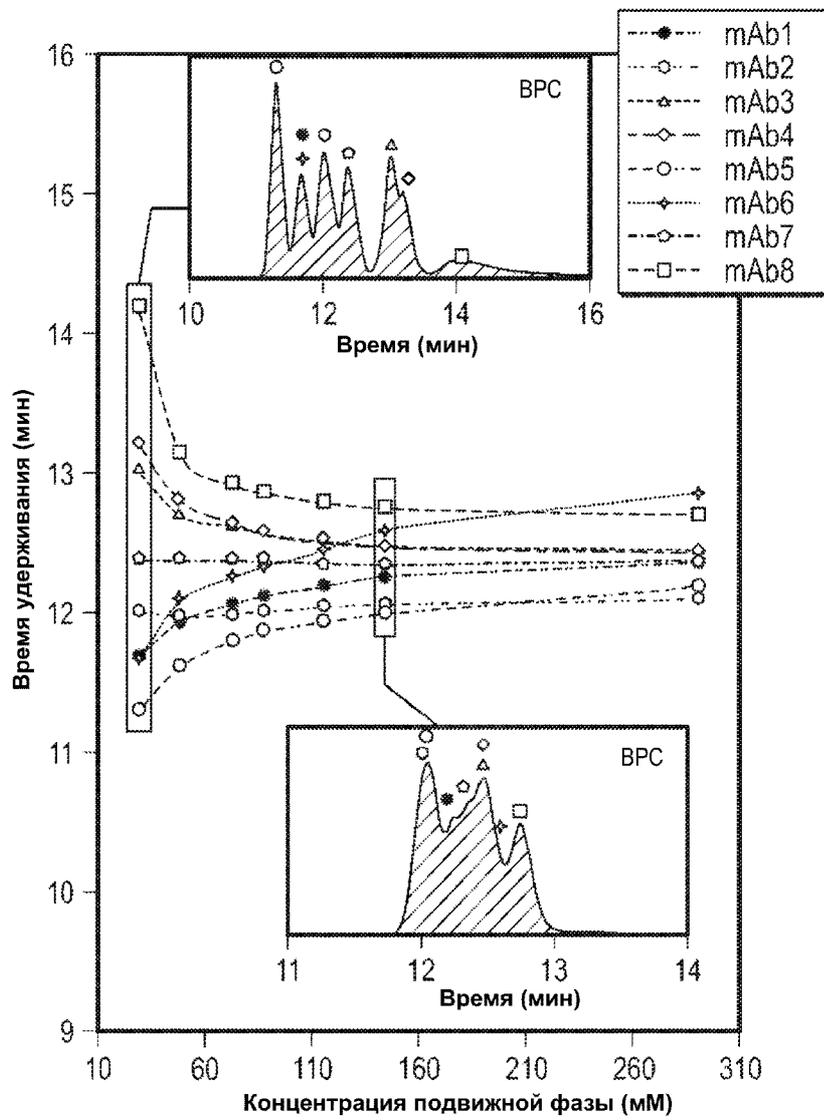
Фиг. 2



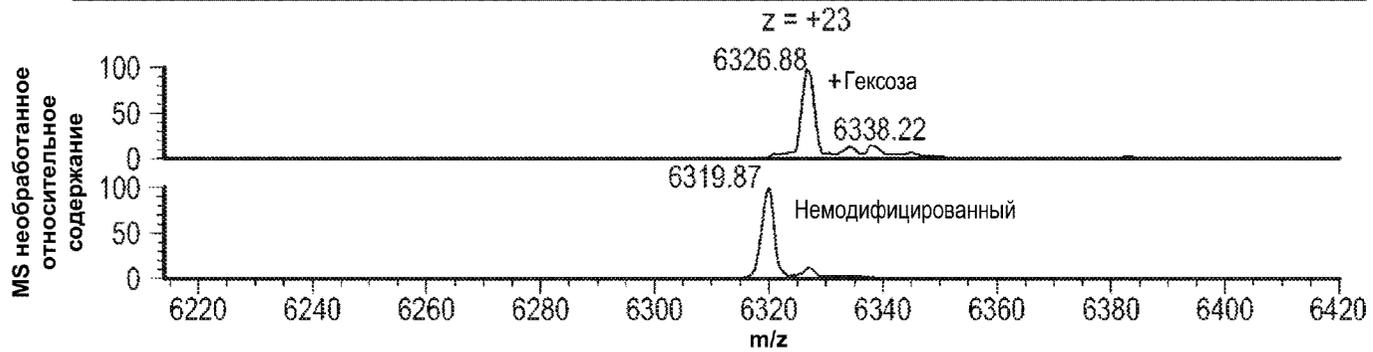
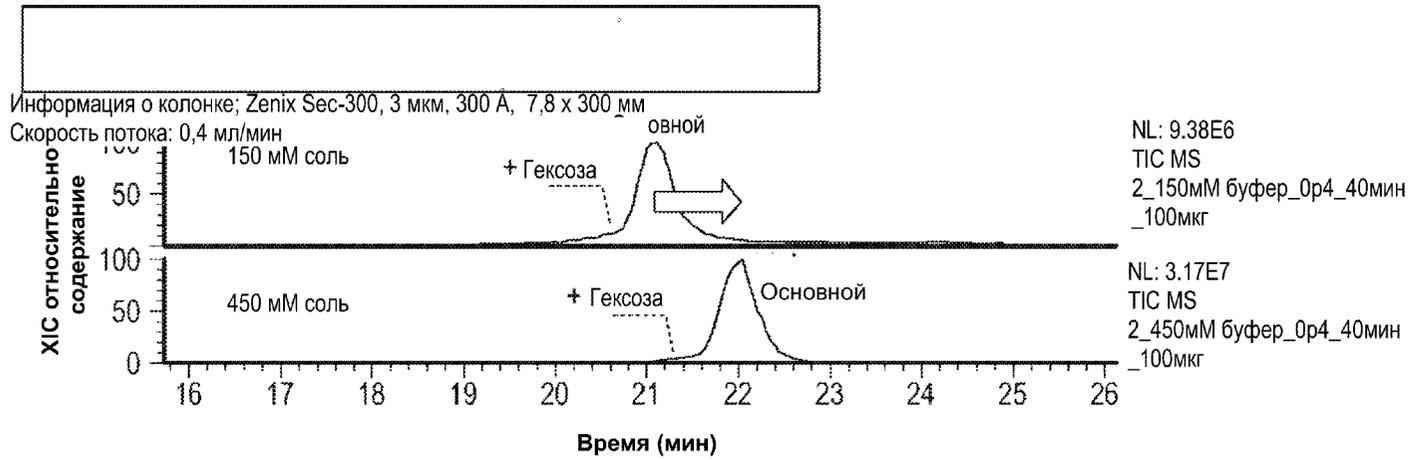
Фиг. 3



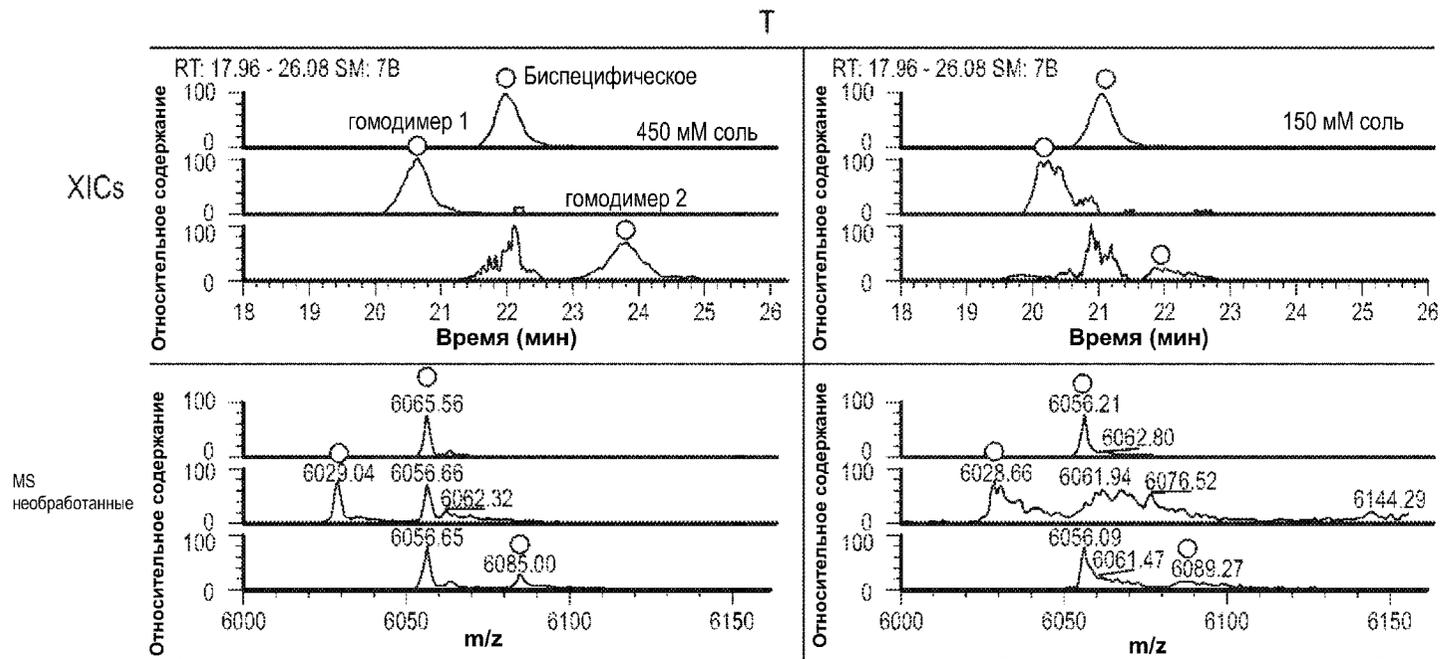
Фиг. 4



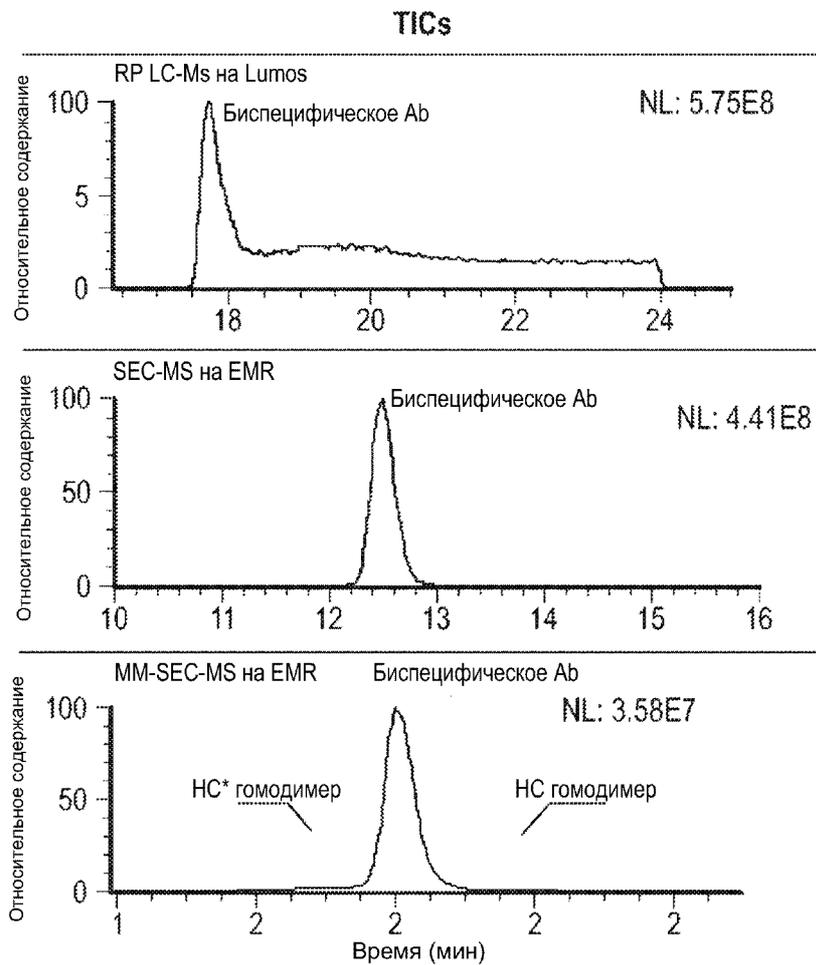
Фиг. 5



Фиг. 6

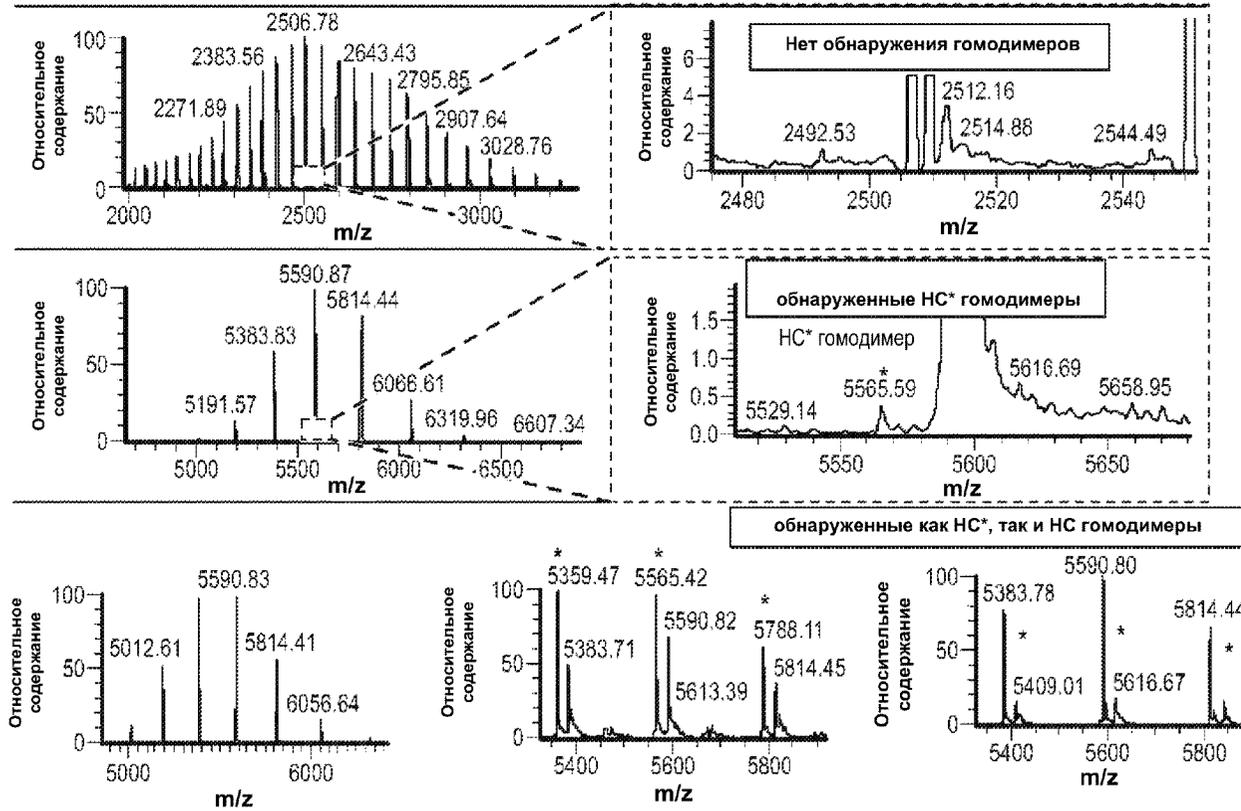


Фиг. 7

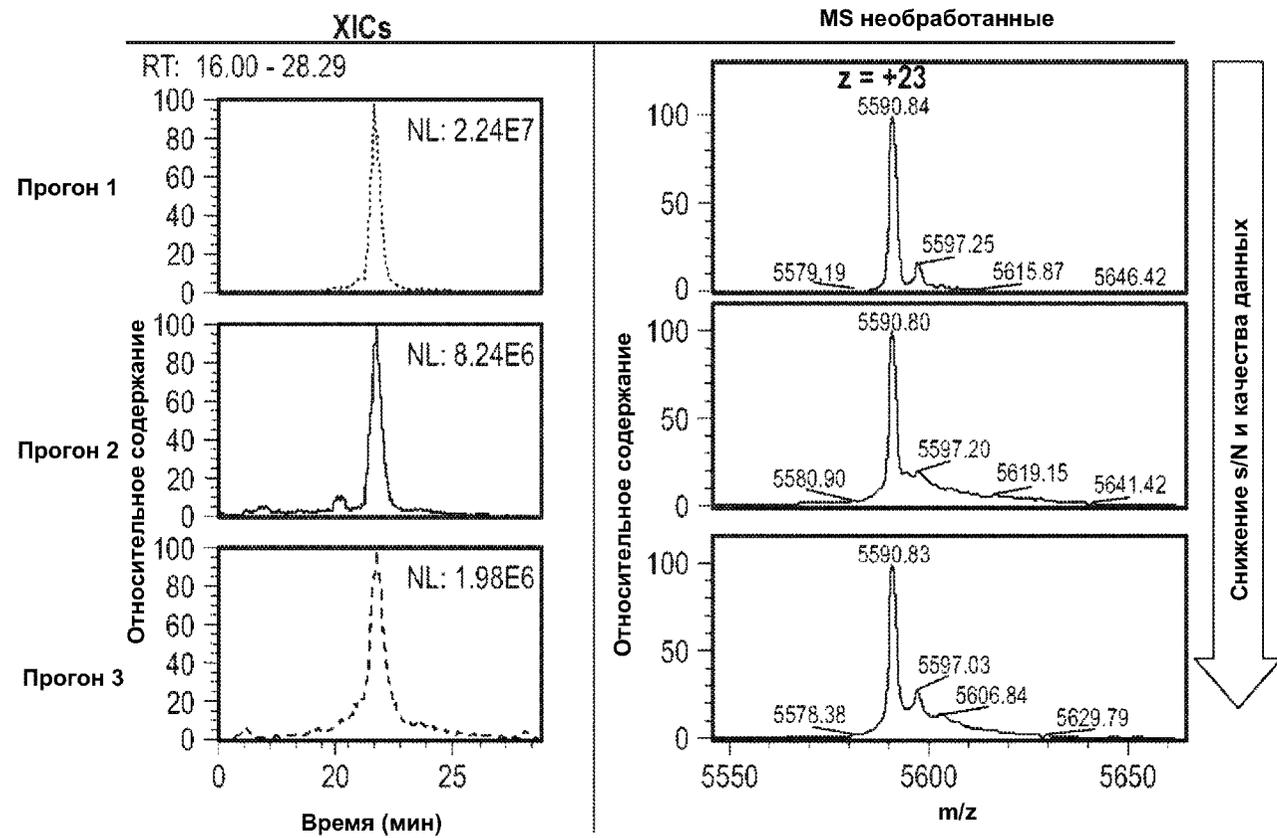


Фиг. 8 (продолжение)

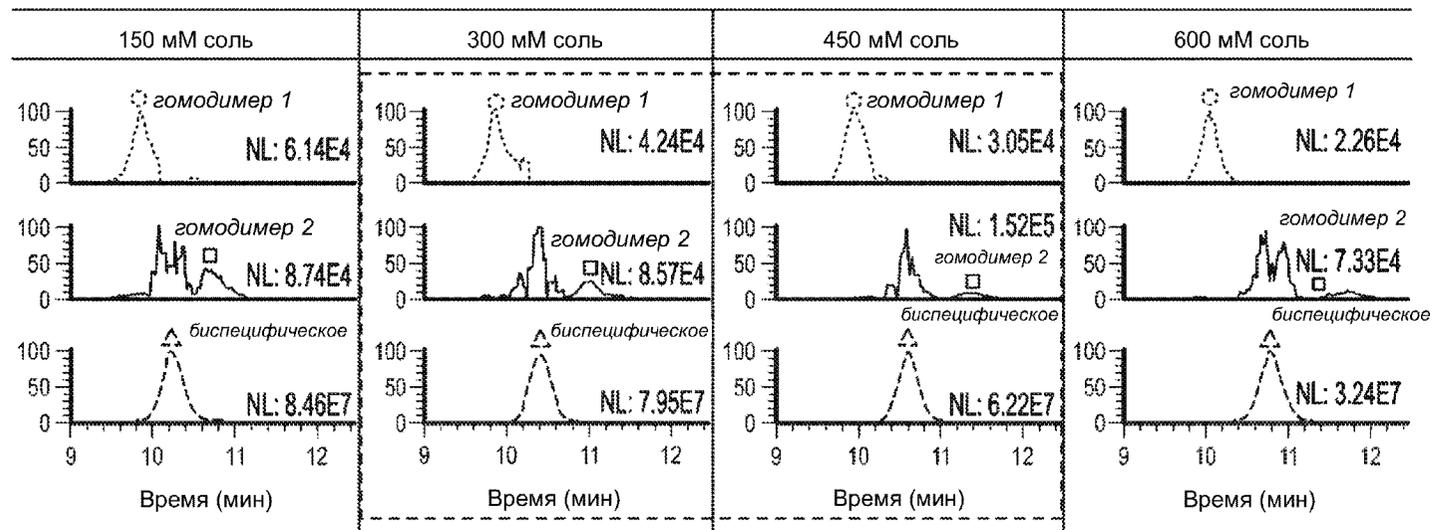
MS необработанные



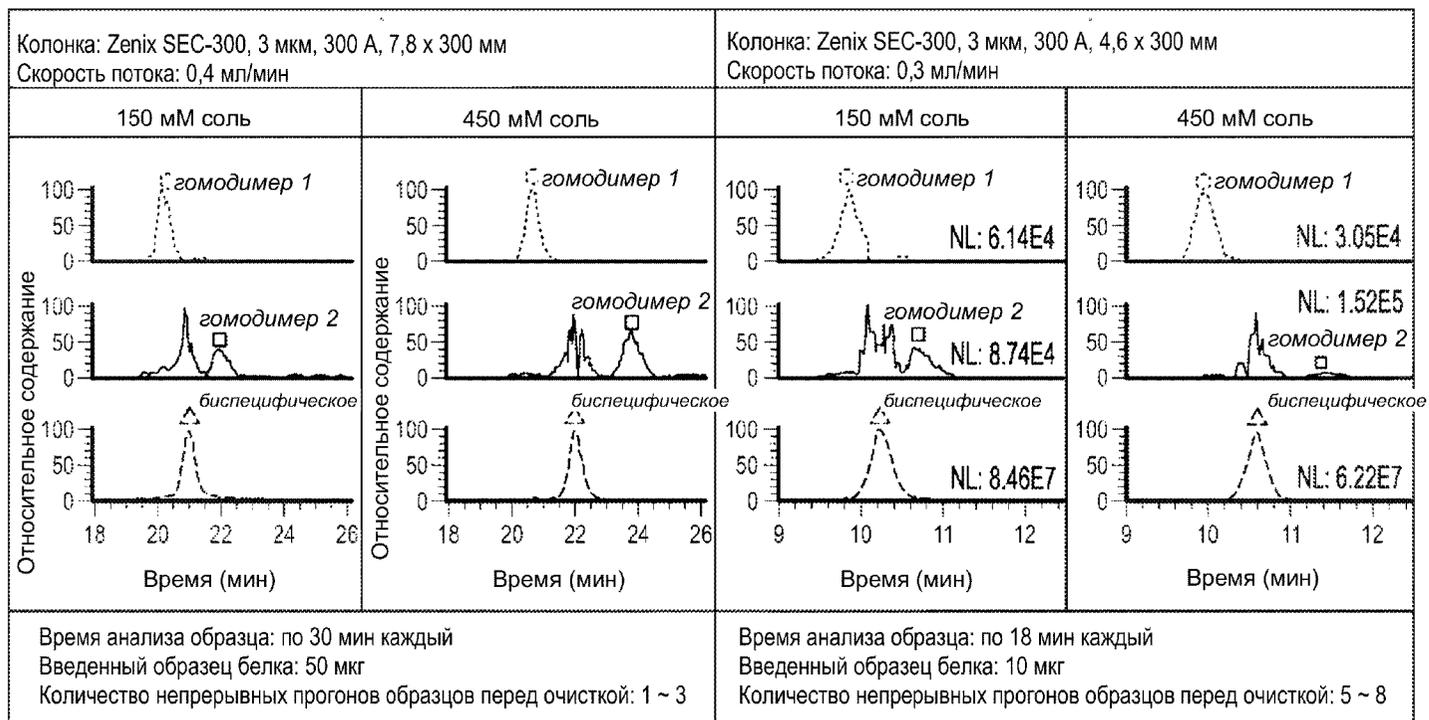
Фиг. 8



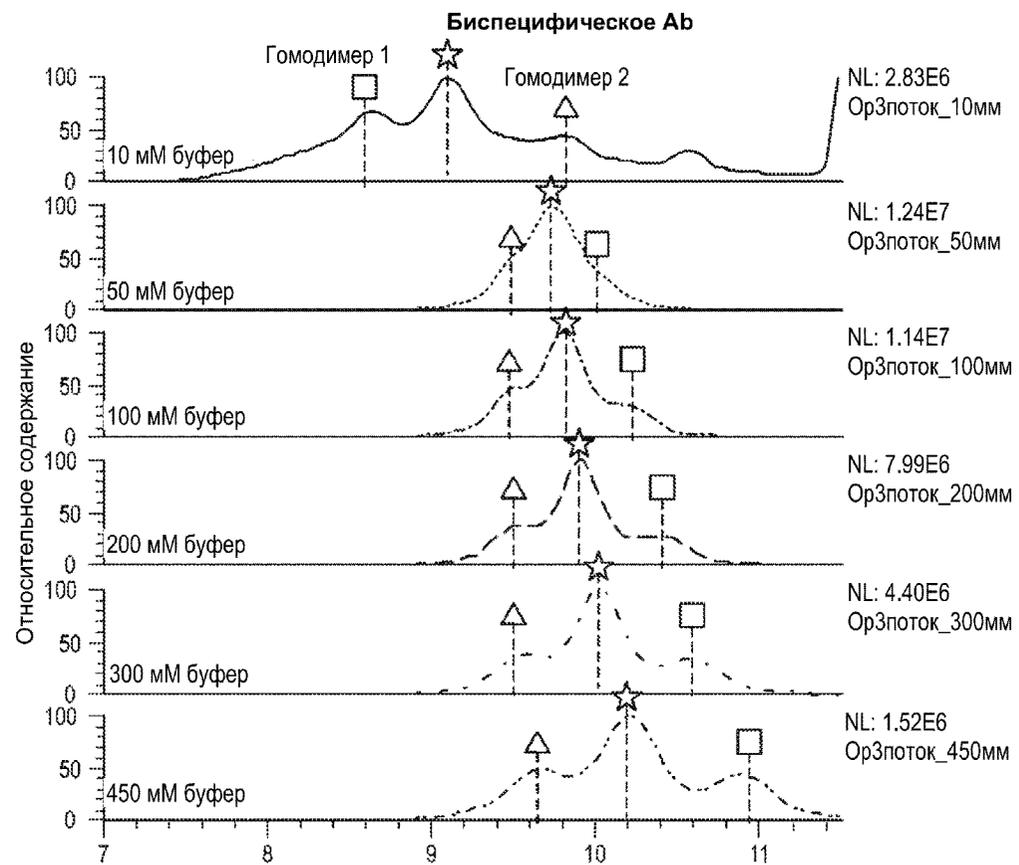
Фиг. 9



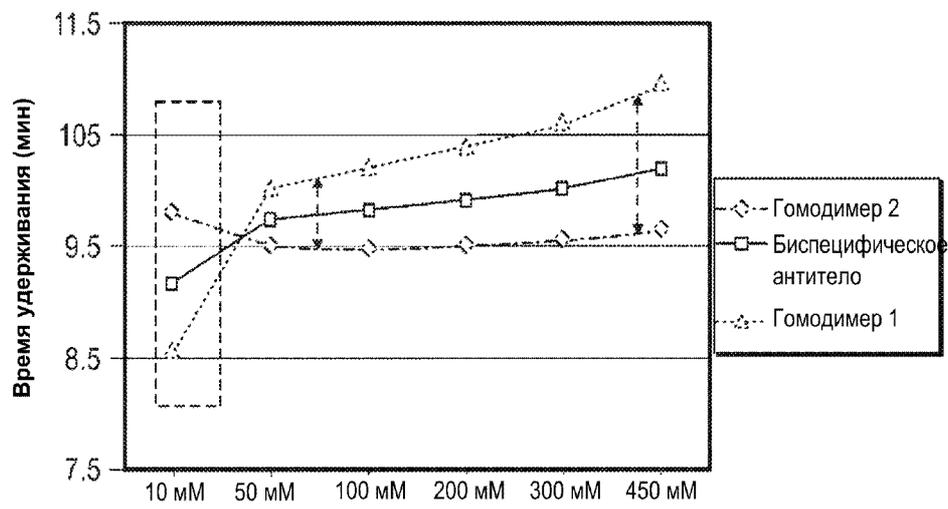
Фиг. 10



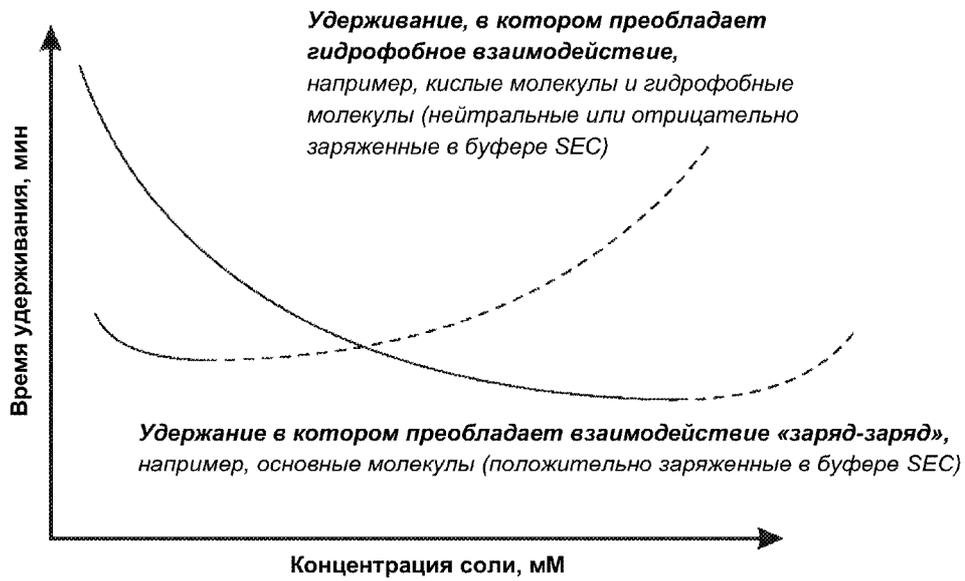
Фиг. 11



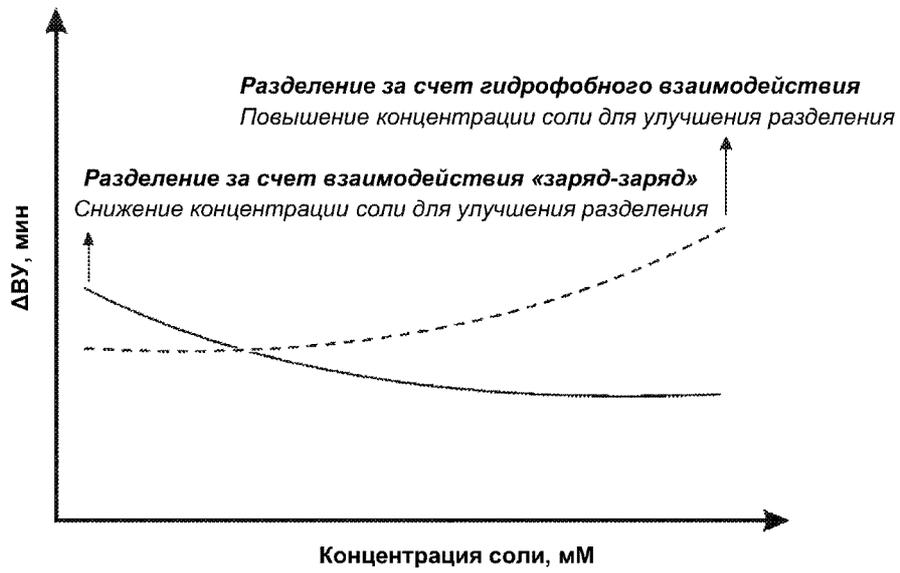
Фиг. 12



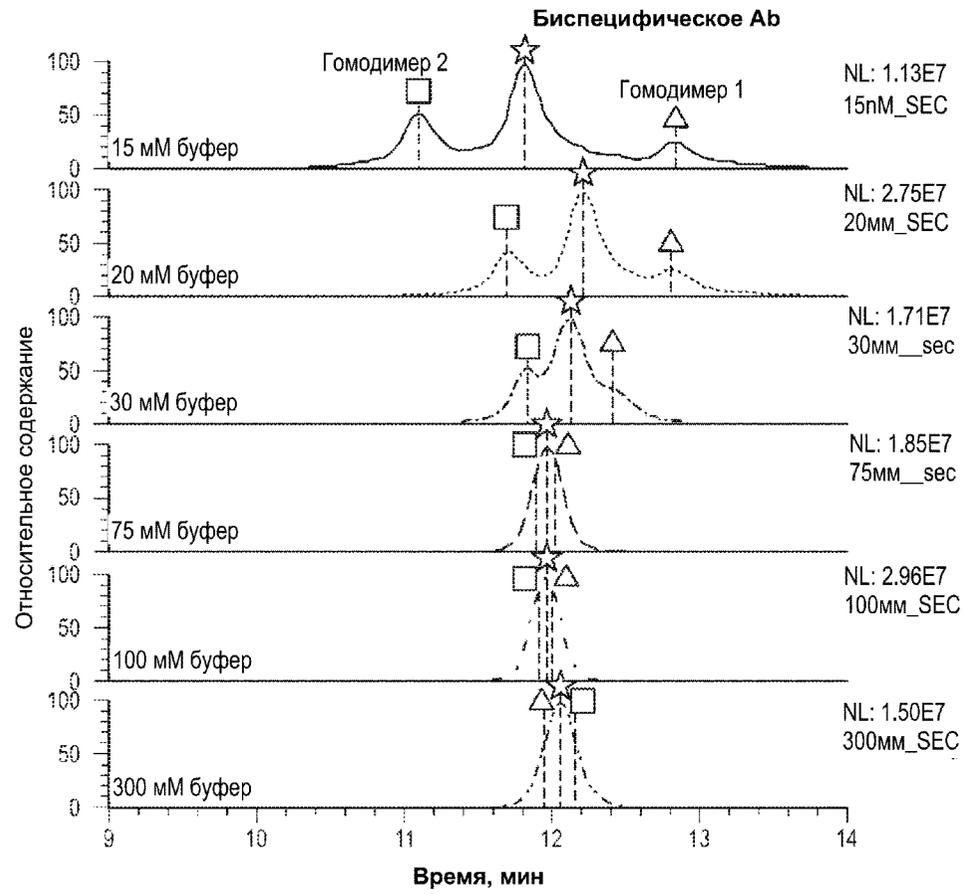
Фиг. 13



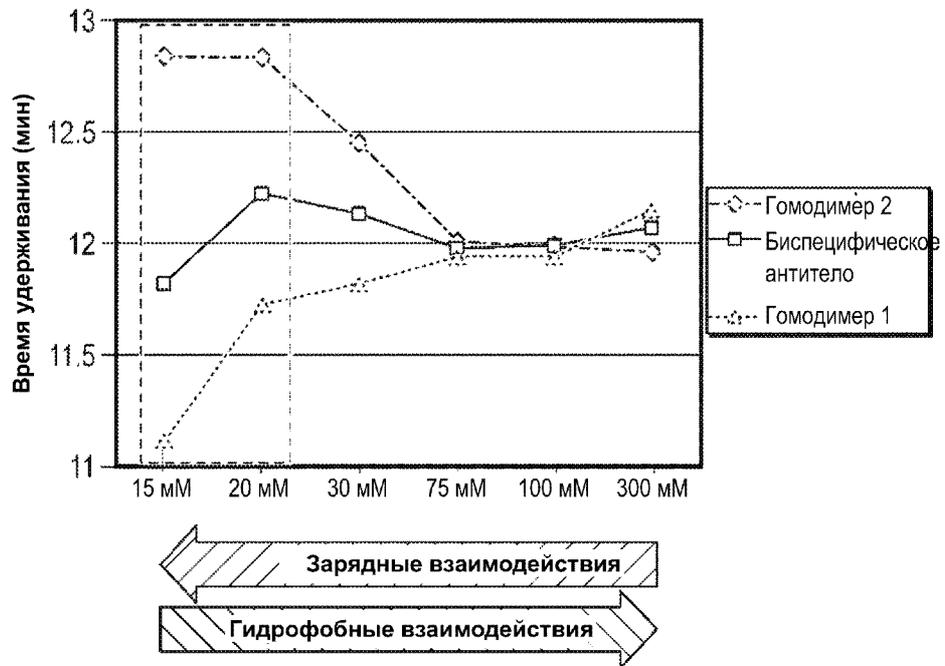
Фиг. 14



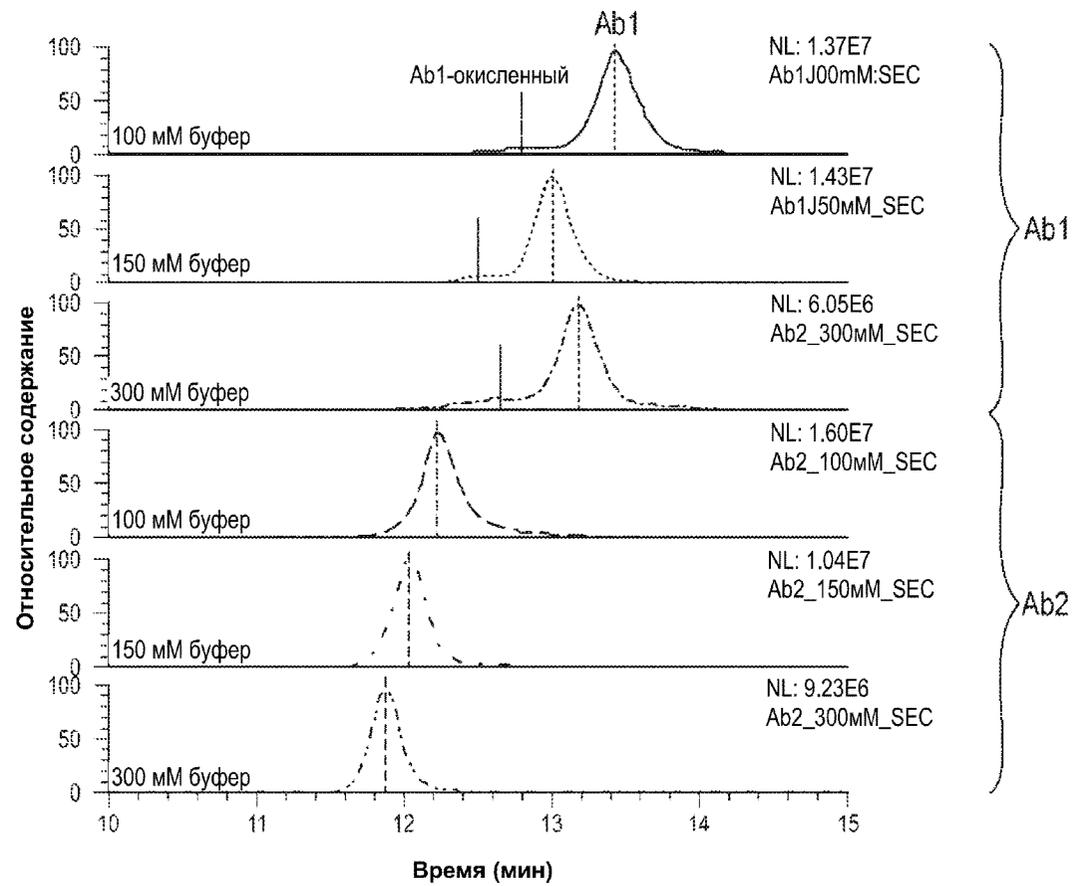
Фиг. 15



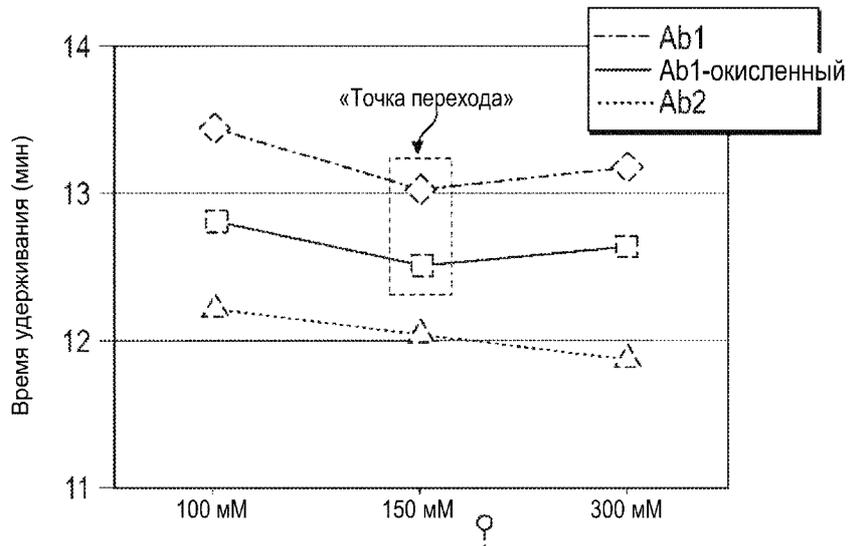
Фиг. 16



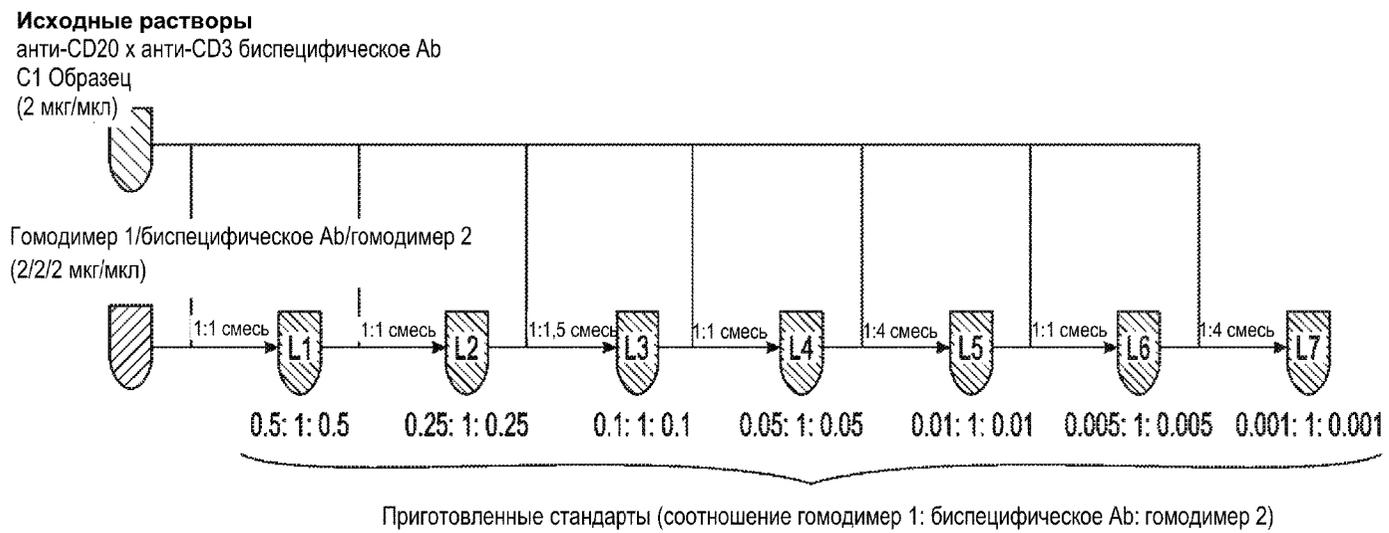
Фиг. 17



Фиг. 18

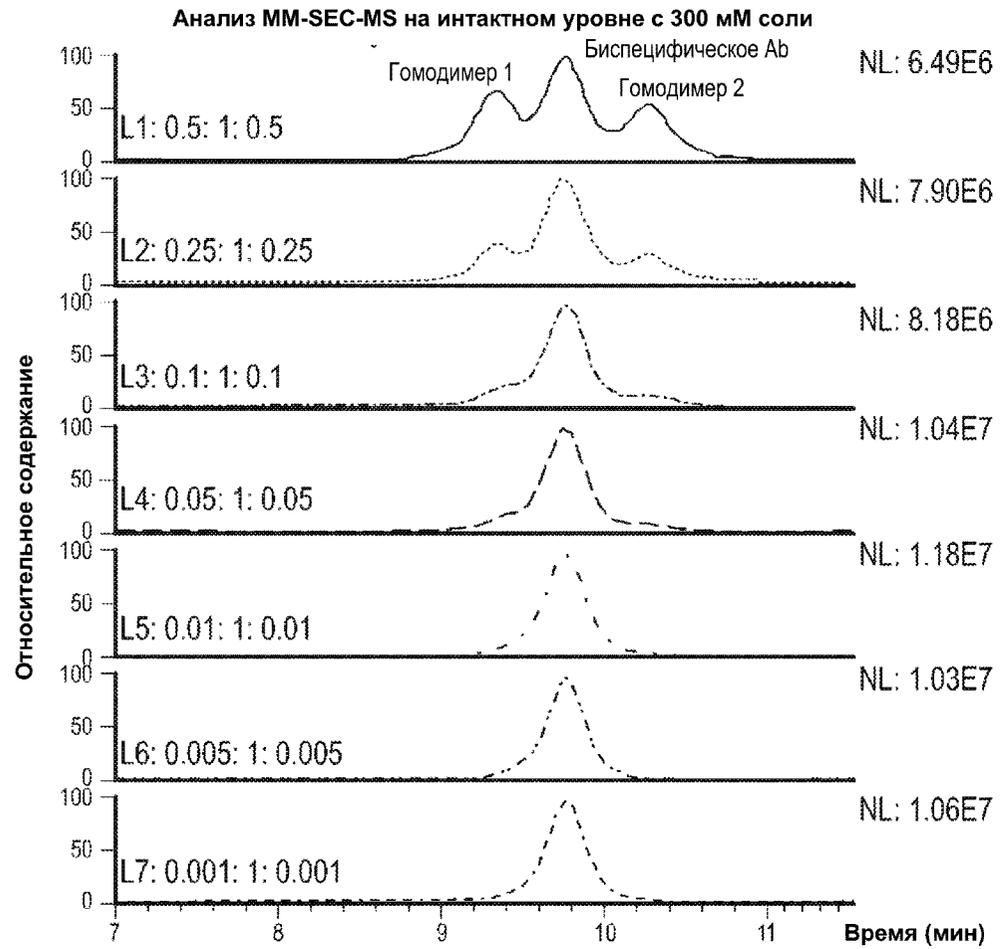


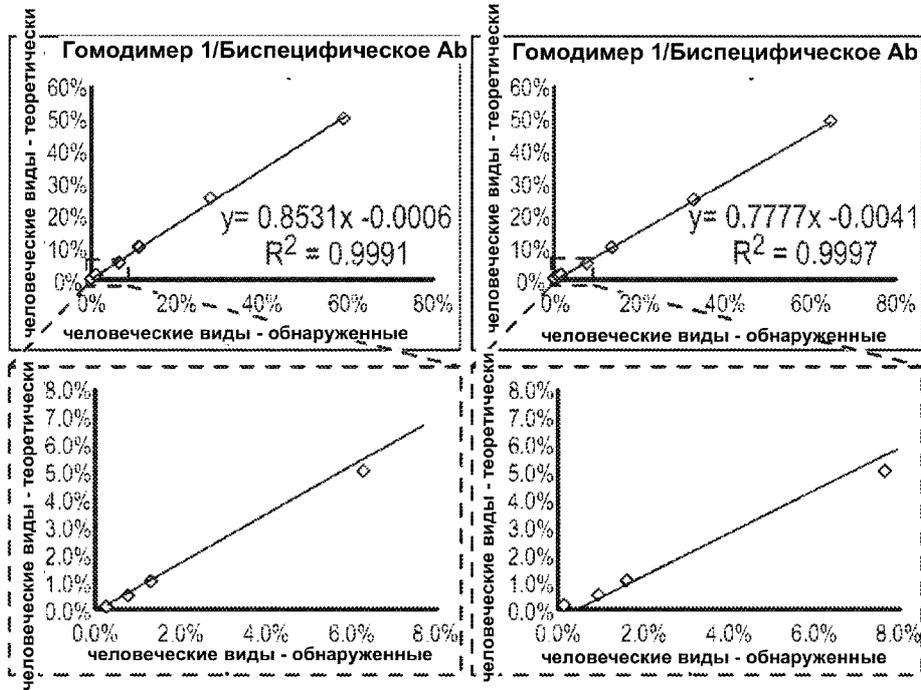
Фиг. 19



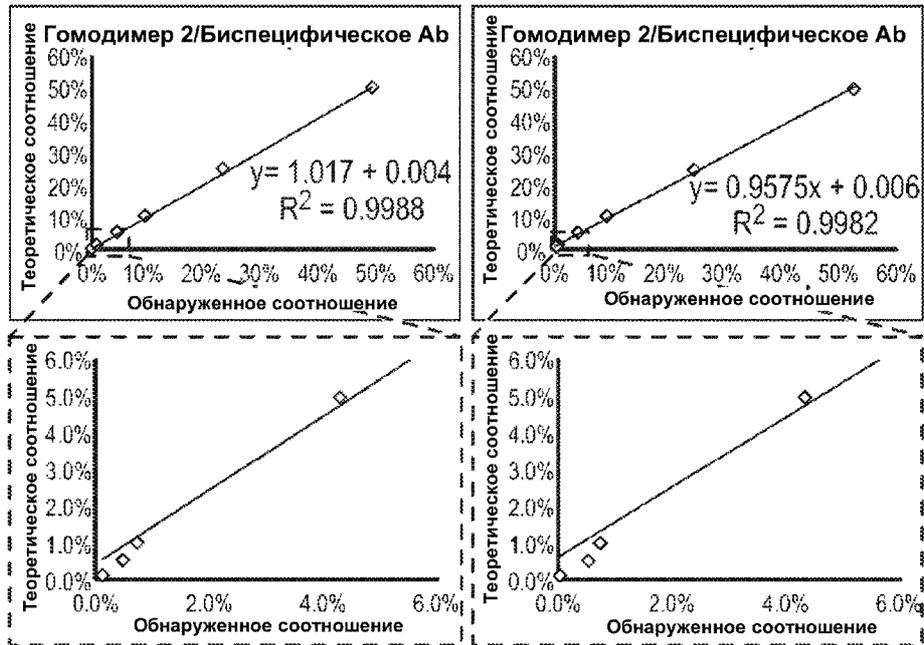
Фиг. 20

Фиг. 21

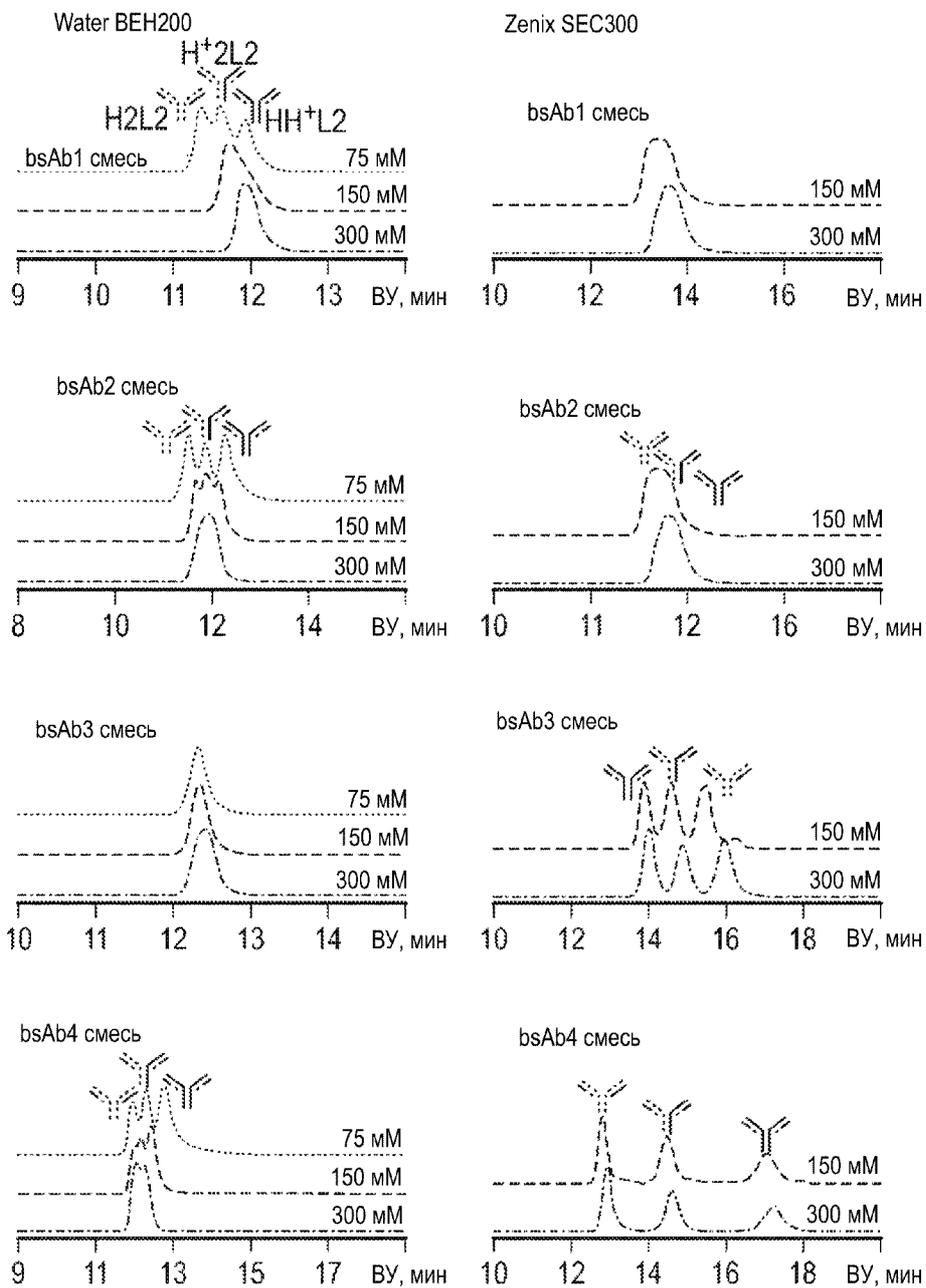




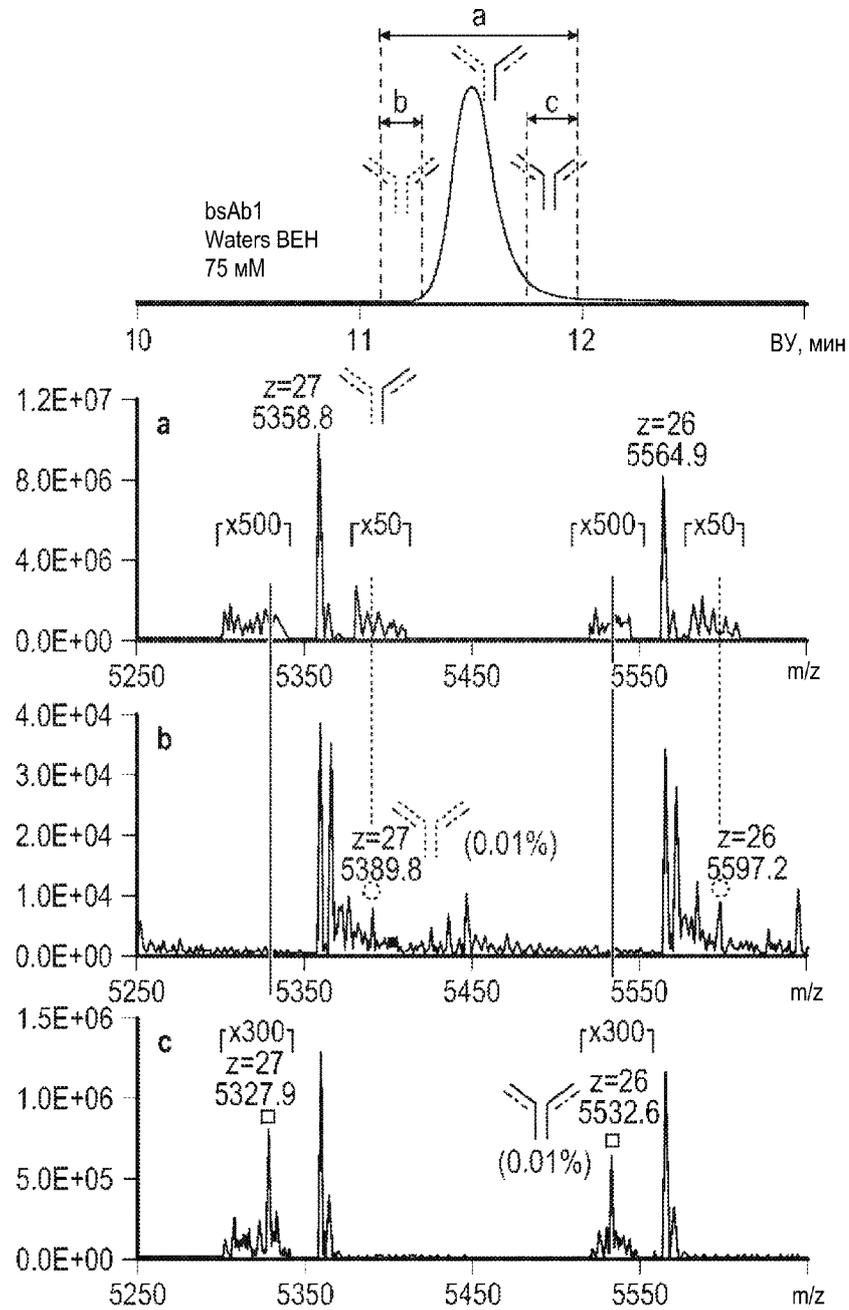
Фиг. 23



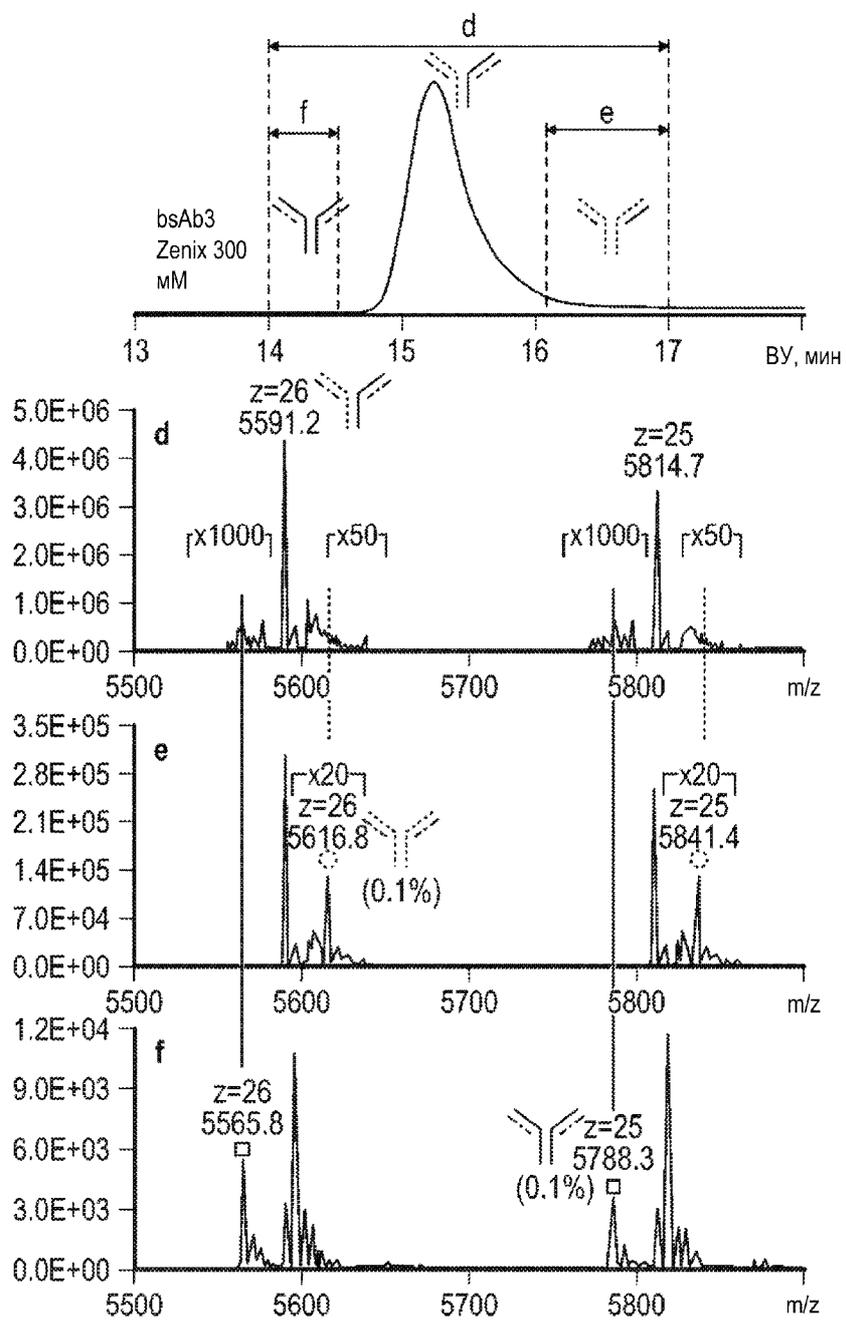
Фиг. 24



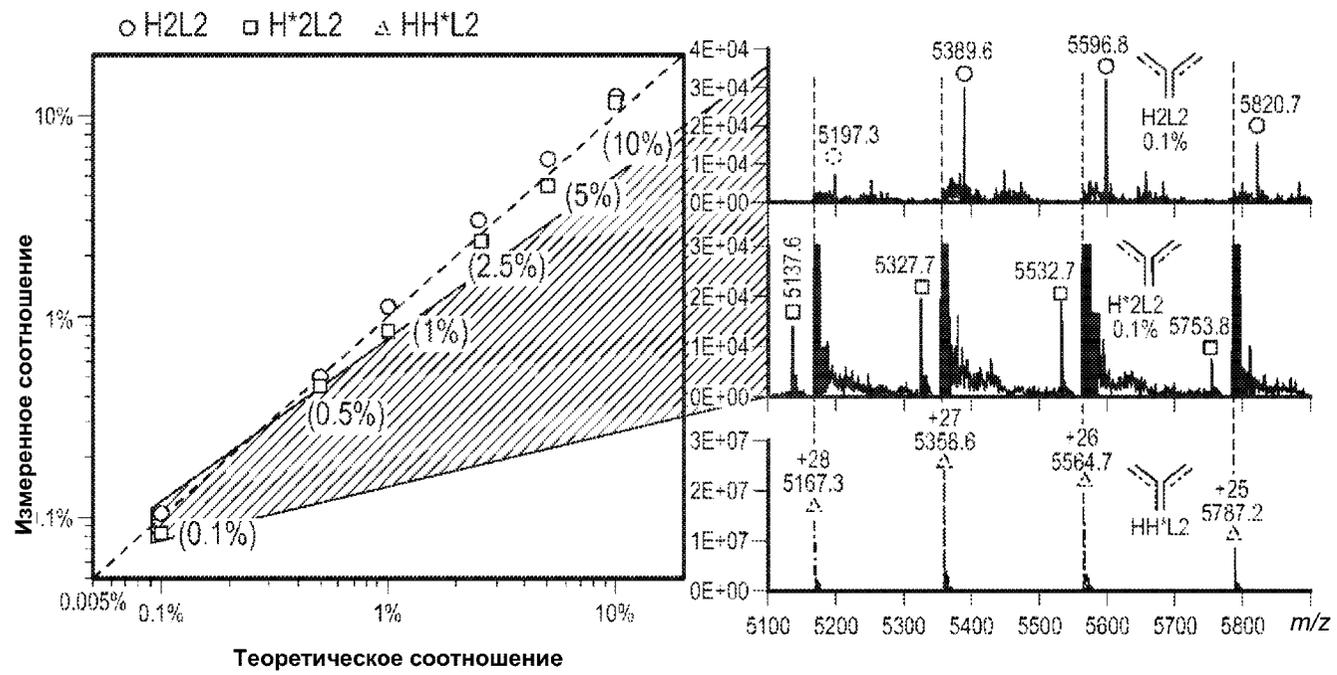
Фиг. 25



Фиг. 26 (продолжение)



Фиг. 26



Фиг. 27

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
 Caplan, Jonathan S.
 Kramer Levin Naftalis & Frankel LLP
 1177 Avenue of the Americas
 New York, New York 10036
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
 THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
 THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
 SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year)	11 February 2020 (11-02-2020)
Applicant's or agent's file reference 070816-01023	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2019/058759	International filing date (day/month/year) 30 October 2019 (30-10-2019)
Applicant REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.	

- The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.
Filing of amendments and statement under Article 19:
 The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):
When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.
How? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70
For more detailed instructions, see PCT Applicant's Guide, International Phase, paragraphs 9.004 - 9.011.
- The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
- With regard to any protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
 - the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with any applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
 - no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.
- 4. Reminders**
 The applicant may **submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority** to the International Bureau. These comments will be made available to the public after international publication. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established.
 Shortly after the expiration of **18 months from the priority date, the international application will be published** by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau before the completion of the technical preparations for international publication (Rules 90bis.1 and 90bis.3).
 Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for **entry into the national phase** before those designated Offices. In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months. For details about the applicable time limits, Office by Office, see www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html and the *PCT Applicant's Guide, National Chapters*.
 Within **22 months from the priority date, the applicant may request that a supplementary international search be carried out** by a different International Searching Authority that offers this service (Rule 45bis.1). The procedure for requesting supplementary international search is described in the *PCT Applicant's Guide, International Phase, paragraphs 8.006-8.032*.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer VASILAKIS, Stylianos Tel: +49 (0)89 2399-8554
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 070816-01023	FOR FURTHER ACTION		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/US2019/058759	International filing date (day/month/year) 30 October 2019 (30-10-2019)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 31 October 2018 (31-10-2018)	
Applicant REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- the international application in the language in which it was filed
 a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- the text is approved as submitted by the applicant
 the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
 as suggested by the applicant
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. none of the figures is to be published with the abstract

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. G01N33/68
 ADD.
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 G01N
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WONG CINTYU ET AL: "Facile method of quantification for oxidized tryptophan degradants of monoclonal antibody by mixed mode ultra performance liquid chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, vol. 1270, 5 November 2012 (2012-11-05), pages 153-161, XP028960074, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2012.10.064 abstract page 154</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	<p>1,4-9, 11,13-18</p>

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents :
- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 - *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date
 - *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 - *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 - *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 - *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 - *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 - *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 - *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 22 January 2020	Date of mailing of the international search report 11/02/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Moreno de Vega, C

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YAN HE ET AL: "On-line coupling of size exclusion chromatography with mixed-mode liquid chromatography for comprehensive profiling of biopharmaceutical drug product", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, vol. 1262, 10 September 2012 (2012-09-10), pages 122-129, XP055371351, AMSTERDAM, NL ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.09.012</p>	1,2,4-6, 8,9, 11-19
Y	<p>abstract; figure 2 page 123, right-hand column, paragraph 1 - page 128, right-hand column, paragraph 1</p>	1-19
Y	<p>----- XIAOYU YANG ET AL: "Analysis and purification of IgG4 bispecific antibodies by a mixed-mode chromatography", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 484, 1 September 2015 (2015-09-01), pages 173-179, XP055411888, AMSTERDAM, NL ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/j.ab.2015.06.014 cited in the application abstract page 174</p>	1-19
Y	<p>----- PAVON JORGE ALEXANDER ET AL: "Analysis of monoclonal antibody oxidation by simple mixed mode chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1431, 13 January 2016 (2016-01-13), pages 154-165, XP029388332, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2015.12.068 abstract page 155 - page 157</p>	1-19
X	<p>----- EHKIRCH ANTHONY ET AL: "Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1086, 12 April 2018 (2018-04-12), pages 176-183, XP085387507, ISSN: 1570-0232, DOI: 10.1016/J.JCHROMB.2018.04.010 abstract paragraph [02.5] - paragraph [0004]</p>	1-19
	----- -/--	

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	YUETIAN YAN ET AL: "Coupling Mixed-Mode Size Exclusion Chromatography with Native Mass Spectrometry for Sensitive Detection and Quantitation of Homodimer Impurities in Bispecific IgG", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 91, no. 17, 2 August 2019 (2019-08-02), pages 11417-11424, XP55658983, US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02793 the whole document -----	1-19

TITLE: METHOD AND SYSTEM OF IDENTIFYING AND QUANTIFYING A PROTEIN

APPLICANT: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

IPC CLASSIFICATION: G01N33/68

EXAMINER: Moreno de Vega, C

CONSULTED DATABASES: DOSYS, WPI, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, NPL

CLASSIFICATION SYMBOLS DEFINING EXTENT OF THE SEARCH:

IPC:

CPC: G01N33/6848

FI/F-TERMS:

KEYWORDS OR OTHER ELEMENTS FEATURING THE INVENTION:

mixed-mode/multimodal size exclusion chromatography

antibody, homodimer

ammonium

salt concentration, hydrophobic

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43*bis*.1)

To:

see form PCT/ISA/220

Date of mailing
(*day/month/year*) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2019/058759

International filing date (*day/month/year*)
30.10.2019

Priority date (*day/month/year*)
31.10.2018

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. G01N33/68

Applicant
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- Box No. I Basis of the opinion
- Box No. II Priority
- Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- Box No. IV Lack of unity of invention
- Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- Box No. VI Certain documents cited
- Box No. VII Certain defects in the international application
- Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Moreno de Vega, C
Telephone No. +49 89 2399-0



Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - the international application in the language in which it was filed.
 - a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
4. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-19</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-19</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43bis.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43bis.1 and 70.9)

see form 210

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Reference is made to the following documents:

- D1 WONG CINTYU ET AL: "Facile method of quantification for oxidized tryptophan degradants of monoclonal antibody by mixed mode ultra performance liquid chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, vol. 1270, pages 153-161, XP028960074, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2012.10.064
- D2 YAN HE ET AL: "On-line coupling of size exclusion chromatography with mixed-mode liquid chromatography for comprehensive profiling of biopharmaceutical drug product", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, vol. 1262, 10 September 2012 (2012-09-10), pages 122-129, XP055371351, AMSTERDAM, NL ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/j.chroma.2012.09.012
- D3 XIAOYU YANG ET AL: "Analysis and purification of IgG4 bispecific antibodies by a mixed-mode chromatography", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 484, 1 September 2015 (2015-09-01), pages 173-179, XP055411888, AMSTERDAM, NL ISSN: 0003-2697, DOI: 10.1016/j.ab.2015.06.014
- D4 PAVON JORGE ALEXANDER ET AL: "Analysis of monoclonal antibody oxidation by simple mixed mode chromatography", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1431, 13 January 2016 (2016-01-13), pages 154-165, XP029388332, ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/J.CHROMA.2015.12.068
- D5 EHKIRCH ANTHONY ET AL: "Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B: BIOMEDICAL SCIENCES & APPLICATIONS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 1086, 12 April 2018 (2018-04-12), pages 176-183, XP085387507, ISSN: 1570-0232, DOI: 10.1016/J.JCHROMB.2018.04.010

2 The present application does not meet the criteria of Article 33(2) PCT, because the subject-matter of claims 1-19 is not new.

2.1 Document D1 discloses a method utilizing size exclusion - ultra performance liquid chromatography (SE-UPLC) run under moderate hydrophobic conditions (mixed mode) to monitor the heterogeneity in drug product samples. The best separation was obtained using Waters Acquity BEH200 size exclusion column along with a mobile phase consisting of sodium acetate and sodium sulfate that separates IgG into aggregate, monomer, and fragments. The moderate salt concentration resulted in a second mode of separation based on hydrophobicity, resolving a monomer pre-peak from the monomer main peak. Multi-angle light scattering (MALS) determined the pre-peak has a similar mass as the IgG monomer. Characterization of the purified pre-peak fraction using mass spectrometry (MS), and bioactivity revealed this degradant to be a Trp-oxidized IgG monomer with significantly reduced bioactivity.

D1 teaches thus a method for detecting and quantifying impurities or target proteins in a sample, comprising contacting the sample with mixed-mode size exclusion chromatography resin column, running a mobile phase to recover impurity or target protein, and detecting and/or quantifying said impurity or target protein by mass spectrometry. D1 is novelty destroying for claims 1, 4-9, 11, 13-18.

2.2 Document D2 discloses a methodology based on on-line coupling of size exclusion chromatography (SEC) with mixed-mode liquid chromatography (LC), the method allowing for simultaneous measurement of a wide range of components in biopharmaceutical drug products, e.g. active pharmaceutical ingredient (protein) and various kinds of excipients such as cations, anions, nonionic hydrophobic surfactant and hydrophilic sugars. Dual short SEC columns are used to separate small molecule excipients from large protein molecules. The separated protein is quantified using a UV detector at 280 nm. Using a stationary phase with 1.7 μ m particles in SEC allows for the use of volatile buffers for both SEC and mix-mode separation. This facilitates the detection of different excipients by ELSD and provides potential for online characterization of the protein with mass spectrometry (MS). Disclosed is also the use of a BEH200 UPLC SEC column, as in examples of present application,

in conditions of implicit mixed-mode for separation of target protein and impurities with ammonium formate as mobile phase, see Fig 2 and paragraph 3.1.

D2 is novelty destroying for claims 1, 2, 4-6, 8, 9, 11-19.

- 2.3 Document D3 discloses the chromatographic separation for detection of hybrids formed from intact antibodies in their native forms using pembrolizumab as an example. This method employs a mixed-mode chromatography using a Sepax Zenix SEC-300 column to separate a bispecific hybrid from the parental antibodies. The simultaneous quantitative monitoring of the newly formed hybrid and parental antibodies was achieved by UV absorption and/or protein fluorescence. The molecular mass analysis of the bispecific antibodies in the reaction mixtures was performed by SEC-MALLS.
- 2.4 Document D4 describes a mixed mode chromatography method using the unique property of Sepax Zenix SEC-300MK column to analyze mAb oxidation levels. The separation of oxidized species relied upon the mixed mode of size exclusion and hydrophobic interaction between the resin and antibodies.
- 2.5 D5 teaches exhaustive and systematic evaluation of the possibilities and versatility of SEC direct hyphenation to native MS or IM-MS (SEC-nativeMS/IM-MS) for the characterization of a variety of mAb-formats (IgGs, ADCs, bispecific mAbs and Fc-fusion proteins), see abstract. First, online SEC-native MS allows automated sample preparation, resulting in high resolution mass spectra and improved mass accuracies (<80 ppm) compared to manual buffer exchange procedures. When hyphenated to ion mobility, SEC-native IM-MS can deliver conformational characterization through collision cross section (CCS) measurements within few minutes without affecting mAb structures. Finally, benefits of online SEC-nativeIM-MS compared to standalone SEC-UV or native MS techniques are demonstrated for higher order structure characterization of mAb forced degraded samples. The use of the SEC column BEH200 in the experiments implies a mixed-mode method with ammonium acetate 100 mM as mobile phase (e.g. paragraphs 3.1.1, 3.2.2) D5 is novelty destroying for present claims 1-19.

- 3 Even if novelty was restored by amendment, then it would still be unclear how this goes beyond the normal course of progress following on from D1, D2 and D5, alone or in combination with D3 and D4. Indeed, documents D1-D5 all clearly disclose the analysis of antibodies and detection and quantification of the antibodies and impurities in mixed samples using mixed mode SEC chromatography. The coupling of the SEC column to a mass spectrometer is implicitly disclosed in D1 and D2, and described in D5.

Furthermore, even if there is no pointer or suggestion in the prior art towards the addition of a distinguishing feature, if said modification is not linked to a particular functionality, then it cannot per se constitute the basis for acknowledging an inventive step.

Thus, present claims 1-19 do not meet the requirements of Article 33(3) PCT.

Re Item VI

Certain documents cited

- D6 YUETIAN YAN ET AL: "Coupling Mixed-Mode Size Exclusion Chromatography with Native Mass Spectrometry for Sensitive Detection and Quantitation of Homodimer Impurities in Bispecific IgG",
ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 91, no. 17, 2 August 2019
(2019-08-02), pages 11417-11424, XP55658983,
US ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02793

- 4 Should the priority of the present application not be valid, the above document would be relevant with respect to novelty and inventive step (Articles 33(2) and (3) PCT).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 5 Reference to prior art being incorporated by reference is not allowed, as the application should be self-contained. Said references in the application should be deleted.

- 6 The subject-matter of independent claims 1 and 16-19 is not supported by the description as required by Article 6 PCT, as their scope is broader than justified by the description and drawings. They are not disclosed either in their whole scope, contrary to the requirements of Article 5 PCT. The examples and experiments disclosed in the application deal with the detection and quantification of antibodies and impurities such as homodimer impurities in samples with bispecific antibodies. The claims refer however to the detection and quantification of any protein and any impurity in a sample.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO/ISA)

General information

For all international applications, the competent International Searching Authority (ISA) will establish an international search report (ISR) accompanied by a written opinion of the International Searching Authority (WO/ISA). The WO/ISA may be responded to by

- filing informal comments with the **International Bureau of WIPO (IB)** (where no demand for international preliminary examination (**demand**) is filed)
- filing amendments under Art. 19 PCT (this can be done whether or not a **demand** is filed)
- filing amendments under Art. 34 PCT and/or formal observations in response to objections raised in the **WO/ISA** (where a **demand** is actually filed)

This document explains these possibilities.

Filing informal comments

After receipt of the **ISR and WO/ISA**, the applicant may file informal comments on the **WO/ISA, directly with the IB** (see International Search and Preliminary Examination Guidelines 2.15). These will be communicated to the designated/elected Offices, together with the International Preliminary Report on Patentability (**IPRP**) at 30 months from the priority date.

Amending claims under Art. 19 PCT

The applicant may file **amended claims** under Art. 19 PCT, **directly with the IB** by the later of the following dates:

- 2 months from the date of mailing of the **ISR and the WO/ISA**
- 16 months from the priority date

However, any such amendment received by the **IB** after the expiration of the applicable time limit shall be **considered to have been received on time** by the **IB**, if it reaches it **before** the technical preparations for international publication have been completed (the 15th day prior to the date of publication, see PCT Applicant's Guide, International Phase, 9.013).

For further information, please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220.

Please also note that, when filing amended claims under Art. 19 PCT, such amendments shall be **accompanied by a letter** identifying the amendments made and also the basis for the amendments in the application as originally filed (Rule 46.5(b) PCT). Where a **demand** is filed, failure to comply with this requirement may result in the amendments being ignored in the International Preliminary Examination Report (**IPER**), see Rule 70.2(c-bis) PCT.

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.