

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390702 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.05.05

(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.09.08

(54) СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ
АНТИТЕЛАХ ПУТЕМ СОЧЕТАНИЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ ТРИПСИНОМ,
ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ГРАДИЕНТОВ И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ VoxCar

(31) 63/075,617

(32) 2020.09.08

(33) US

(86) PCT/US2021/049398

(87) WO 2022/055954 2022.03.17

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Не Сун, Грир Тайлер, О`Браен

Джонсон Рейд, Чжэн Сяоцзин, Ли Нин

(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к улучшенному способу профилирования природы нежелательных белков клетки-хозяина (НСП) в препарате терапевтического антитела с использованием улучшенного анализа. Анализ включает три (3) типовых этапа, включающие расщепление с низкой концентрацией трипсина, длинноградиентную жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию (МС) с использованием, в частности, масс-спектрометрии VoxCar. Изобретение позволяет определить чистоту терапевтического антитела, чтобы оно подходило для использования у пациентов.

A1

202390702

202390702

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577594EA/042

СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА В ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АНТИТЕЛАХ ПУТЕМ СОЧЕТАНИЯ РАСЩЕПЛЕНИЯ ТРИПСИНОМ, ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ГРАДИЕНТОВ И МАСС- СПЕКТРОМЕТРИИ VOXCAR

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка заявляет приоритет согласно заявке на патент США № 63/075,617, поданной 8 сентября 2020 г., которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0002] Настоящее раскрытие в целом относится к способам профилирования природы белков клетки-хозяина (HCPs) в препарате терапевтического антитела с помощью усовершенствованного анализа. Анализ включает три (3) примерных этапа, включающие: расщепление с ультразвунизкой концентрацией трипсина, длинноградиентную жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию (МС), в частности, масс-спектрометрию VoxCar.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Терапевтические антитела произвели революцию в медицине и составляют значительную часть недавно разработанных лекарств. Значительные инвестиции в их разработку привели к одобрению 79 терапевтических моноклональных антител (mAb) Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США, а доход от мирового рынка mAb, по прогнозам, достигнет \$300 млрд к 2025 году.

[0004] Все более широкое применение терапии mAb для лечения множества заболеваний объясняется главным образом их высокой специфичностью, сродством ко многим лекарственным мишеням и минимальными побочными эффектами. Однако эти преимущества сдерживаются огромным размером и химической гетерогенностью mAb, а также присутствием загрязняющих белков клетки-хозяина (HCP), образующихся во время экспрессии клеток вместе с терапевтическим белком.

[0005] Популяция HCP терапевтического препарата представляет собой чрезвычайно важную проблему, поскольку она может содержать белки, которые угрожают безопасности пациента или снижают эффективность препарата. Например, иммуногенные HCP могут вызвать непреднамеренный и вредный иммунный ответ у пациентов, а HCP с ферментативной активностью могут разрушать само терапевтическое антитело или вступать в реакцию с компонентом в буфере препарата, снижая стабильность антитела и увеличивая образование видимых частиц.

[0006] Действительно, есть даже сообщения о случаях использования HCP, которые одновременно являются иммуногенными и обладают ферментативным потенциалом. Эти риски привели к необходимости классификации уровней HCP как критического атрибута качества (CQA), который необходимо отслеживать и

контролировать до приемлемого уровня. Нормативные документы не устанавливают конкретных пределов концентрации НСР, но в общепринятой практике используется подход, основанный на оценке риска, при котором максимальное общее значение в очищенном лекарственном препарате составляет 100 ppm или менее.

[0007] Снижение концентрации НСР до таких низких уровней требует осуществления многоступенчатого хроматографического процесса, способного практически устранить тысячи белков с существенными различиями в размерах, чистом заряде, гидрофобности и многих других физико-химических свойствах. Такие процессы обычно начинаются с аффинной хроматографии белка А, которая удаляет большинство НСР, после чего следуют ортогональные этапы очистки, такие как анионный обмен, исключение размера или хроматография гидрофобного взаимодействия для дальнейшего уменьшения популяции и количества остающихся загрязняющих веществ. (Gilgunn, S. et al. *Bones, J. J Chromatogr A* 2019, 1595, 28-38; Liu, H. F. et al. *MAbs* 2010, 2, 480-499; Zhu, M. M. et al. In *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*, 2017, pp 1639-1669.)

[0008] Поскольку успешная стратегия очистки терапевтических антител снижает общий уровень НСР ниже 100 ppm, мониторинг этих аналитов с низкой концентрацией является сложной задачей и часто требует проведения нескольких анализов. Стратегии обнаружения и количественного определения НСР обычно начинаются с иммуноферментного анализа (ИФА). Такая популярность обусловлена высокой специфичностью, точностью и прецизионностью способа, а также простотой его использования и автоматизации. (Zhu-Shimoni, J. et al. *Biotechnol Bioeng* 2014, 111, 2367-2379; Rey, G. et al. *J Pharm Biomed Anal* 2012, 70, 580-586.)

[0009] Однако преимущества ИФА сопровождаются рядом ограничений, которые снижают его полезность. Особенно важно, что для ИФА требуются поликлональные антитела, полученные путем иммунизации животных нулевой клеточной линией, что не полностью покрывает все НСР из производственной клеточной линии и приводит к смещенному обнаружению более иммуногенных НСР. (Zhu-Shimoni, J. et al. *M. Biotechnol Bioeng* 2014, 111, 2367-2379; Henry, S. M. et al. *MAbs* 2017, 9, 1065-1075.) Недооценка уровня НСР также распространена в случаях, когда белки нековалентно связаны с терапевтическим антителом или их концентрация выше, чем способность поликлональных антител. (Anicetti, V. R. et al. *J Immunol Methods* 1986, 91, 213-224.)

[0010] Наконец, хотя наборы ИФА, определяющие один важный НСР (например, фосфолипазу В-подобную 2), существуют и могут быть разработаны для других известных проблемных белков, обычные платформы ИФА измеряют только общую концентрацию белка и не могут идентифицировать конкретные белки или количественно определить их индивидуальную концентрацию. (Henry, S. M. et al. *MAbs* 2017, 9, 1065-1075.) Эти ограничения создают неприемлемые пробелы в характеристике НСР, которые, как ожидают регулирующие органы, должны быть заполнены с помощью ортогональных способов, таких как жидкостная хроматография - тандемная масс-спектрометрия (ЖХ-МС2).

[0011] По этим причинам выгодно иметь надежные и высокоточные анализы с использованием аналитической физической химии для высокоскоростного и точного контроля качества НСР (глубокого профилирования) белковых образцов, например, терапевтических антител. Желательно, чтобы такие анализы имели широкое применение для совершенствования производства антител в клинической разработке и в коммерческом использовании, более высокий общий контроль НСР по сравнению с опубликованными и установленными способами, более высокий охват идентичности и точность, чувствительность около 0,1 ppm, а также более высокую скорость, простоту использования (минимум шагов) и более низкую стоимость по сравнению с другими способами.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0012] В одном аспекте настоящее описание относится к устранению неприемлемых пробелов в определении характеристик НСР с повышенной скоростью и точностью. В частности, настоящее описание обеспечивает высокоскоростной анализ для определения идентичности или количества загрязняющего белка в терапевтическом образце белка, включающий, как правило, три (3) этапа, в ходе которых терапевтический образец белка подвергается: 1) расщепление с ультранизкой концентрацией трипсина, 2) длинноградиентной жидкостной хроматографии и 3) масс-спектрометрии (МС), в частности, масс-спектрометрии VoxCap. Вышеуказанные три этапа, т.е. расщепление с ультранизкой концентрацией трипсина, длинноградиентная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия VoxCap, упоминаются в данном документе под аббревиатурой ULTLB.

[0013] В одном варианте реализации изобретения, анализ подходит для параллельного определения идентичности и количества загрязняющего белка, в частности, белка клетки-хозяина (НСР).

[0014] В одном варианте реализации изобретения, анализ может определять идентичность загрязняющего белка по аминокислотной последовательности или частичной последовательности, достаточной для идентификации белка.

[0015] В некоторых вариантах реализации изобретения, анализ может определять количество загрязняющего белка на уровне, измеряемом в частях на миллион (ppm), где количество загрязняющего белка определяется с чувствительностью в частях на миллион (ppm) на уровне около 10, 5, 2, 1, 0,1 или меньше и интервалы между ними, т.е. менее 10 ppm, менее 5 ppm, менее 2 ppm, менее 1 ppm или менее 0,1 ppm.

[0016] В вариантах реализации изобретения анализ, в принципе, может быть использован для исследования любого образца терапевтического белка на наличие примесей НСР и, в частности, для терапевтических белков, таких как антитело, вариант антитела или слияние антител.

[0017] Соответственно, анализ может быть использован для применения к потоку очистки любого количества терапевтических антител, вариантов и слияний, перечисленных в настоящем документе (см. подраздел «Широкое применение анализа»).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0018] Сопроводительные графические материалы, которые включены в настоящую спецификацию и являются ее частью, иллюстрируют несколько вариантов осуществления раскрытия и вместе с описанием служат для объяснения принципов описания.

[0019] ФИГ. 1: демонстрирует схему иллюстративного анализа, состоящего из трех (3) основных этапов, как указано: Этап 1 демонстрирует, что образец терапевтического антитела, содержащий белки клетки-хозяина (HCPs), подвергается процессу расщепления с ультранизкой концентрацией трипсина; Этап 2 демонстрирует, что полученные в результате расщепления полипептиды подвергаются процессу жидкостной хроматографии с длинным градиентом; и Этап 3 демонстрирует, что полипептиды, полученные на предыдущем Этапе 2, подвергаются процессу получения с помощью масс-спектрометрии BoxCar, в результате чего (как показано на диаграмме Венна) достигается значительное улучшение по сравнению с предыдущими способами.

[0020] Вышеуказанные три этапа, т.е. расщепление с ультранизкой концентрацией трипсина, длинноградиентная жидкостная хроматография и масс-спектрометрия BoxCar, обозначаются в данном документе аббревиатурой ULTLB, как показано на ФИГ. 1. Термин «BoxCar» относится, например, к селективному МС-сканированию, состоящему из 12 изолирующих окон, т.е. «боксов», для достижения большей точности (см. также ФИГ.3).

[0021] ФИГ. 2A: демонстрирует образцы антител, включающие стандарт антитела (NISTmAb), когда они подвергаются различным условиям расщепления трипсином с уменьшающейся силой, слева направо, от нормального, нативного и ультранизкого. Каждый образец прогоняли в двух экземплярах.

[0022] На левой панели показано, что наибольшее количество HCPs идентифицируется при использовании ультранизких условий по сравнению с нормальными и нативными условиями расщепления.

[0023] На правой панели показано наибольшее количество уникальных пептидов, идентифицированных при использовании ультранизких условий по сравнению с нормальными и нативными условиями расщепления.

[0024] ФИГ. 2B: демонстрирует образцы антител, включающие стандарт антитела (NISTmAb) из вышеупомянутых условий расщепления, когда они подвергались различной длине колонки жидкостной хроматографии (ЖХ) (25 см или 50 см) и длине градиента (2 часа или 4 часа), слева направо. Каждый образец прогоняли в двух экземплярах.

[0025] На левой панели показано, что наибольшее количество HCPs идентифицируется при использовании длинной колонки (50 см) и длинного градиента (4 часа) по сравнению с короткой колонкой (25 см) и коротким градиентом (2 часа).

[0026] На правой панели показано наибольшее количество уникальных пептидов, идентифицированных при использовании длинной колонки (50 см) и длинного градиента (4 часа) по сравнению с короткой колонкой (25 см) и коротким градиентом (2 часа).

[0027] ФИГ. 3А-3С: демонстрируют профили получения VoxCar, которые улучшили идентификацию НСР за счет усиления МС-сигнала пептидов с низкой концентрацией. ФИГ. 3А демонстрирует репрезентативный пример стандартного полного сканирования. ФИГ. 3В демонстрирует смежное сканирование VoxCar, состоящее из 12 узких изолирующих окон («боксов»). На ФИГ. 3А и ФИГ. 3В, затененные вставки подчеркивают заметное увеличение сигнала пептидов при сканировании VoxCar по сравнению с полным сканированием. Для сравнения приведены соотношения сигнал/шум (S/N). ФИГ. 3С демонстрирует, что значительное улучшение идентификации НСР (около 51%) было получено при использовании образцов для сбора данных VoxCar по сравнению с традиционным сбором данных (DDA).

[0028] ФИГ. 4: демонстрирует на панели А вклад в общее улучшение идентификации НСР с помощью способа ULTLB от оптимизации пробоподготовки, ЖХ и получения МС. Обозначения рисунков следующие: Нативное - нативное расщепление; 25 см и 50 см - длина колонки; 2 ч и 4 ч - время градиента. На панели В представлена диаграмма Венна, сложенная в стопку, где показано общее количество НСР, идентифицированных с помощью ULTLB, по сравнению со способами нативного расщепления и обогащения MWSO. Всего способами, включая ULTLB, было идентифицировано 453 НСР.

[0029] ФИГ. 5: демонстрирует на панели А сложенную диаграмму Венна, указывающую на высокое совпадение (92%) НСР, идентифицированных в дубликатах (Rep 1 и Rep 2, как указано). На панели В демонстрирует корреляцию Пирсона, указывающую на высокую согласованность идентифицированного количества белков в дубликатах (Rep 1 и Rep 2, как указано).

[0030] ФИГ. 6: демонстрирует на панели А сложенную диаграмму Венна, сравнивающую два (2) предыдущих способа обнаружения НСР для образцового терапевтического антитела REGN mAb1 (белок А и нативное расщепление) по сравнению с иллюстративными способами в соответствии с иллюстративными вариантами воплощения, описанными в настоящем документе (способы с использованием ULTLB). Эта информация также представлена в табличной форме. На панели В показана сложенная диаграмма Венна, сравнивающая два (2) предыдущих способа обнаружения НСР для второго примерного терапевтического антитела REGN mAb2 (белок А и нативное расщепление) по сравнению с иллюстративными способами в соответствии с иллюстративными воплощениями, описанными в настоящем документе (способы с использованием ULTLB). Эта информация также представлена в табличной форме.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0031] 1. Определения

[0032] Термин «аналитическая техника или аналитическая химия» относится к количественному анализу полипептидных молекул с целью осуществления иллюстративных способов, используя, например, жидкостную хроматографию (ЖХ), масс-спектрометрию (МС) или их комбинацию.

[0033] Термин «антитело» относится к терапевтическому иммунобиндеру, например, моноклональному антителу, би- или мультиспецифическому антителу, которое подходит для введения субъекту для модуляции заболевания или расстройства, например, иммунного или онкологического расстройства. Термин «антитело» следует толковать широко, описывая моноклональные антитела, биспецифические антитела, композиции антител с мультиспецифичностью, а также фрагменты или субъединицы антител (например, Fab, F(ab')₂, scFv, Fv, Fd, Fc/2 и ЖХ), производные антител, слияния, варианты и аналоги.

[0034] Термин «BoxCar» относится к аналитической методике для характеристики полипептида, известной как методика MC, в которой имеется одно или более окон или «боксов», которые селективно анализируются.

[0035] Термин «DDA» относится к аналитической методике для характеристики полипептида, известной как Data Dependent Acquisition в связи с выполнением этапа масс-спектрометрии.

[0036] Термин «глубокое профилирование» относится к способности, используя аналитические способы (например, MC), достигать высокого выходного количественного определения белка из образца.

[0037] Термины «HCP» и «HCPs» относятся к единственному и множественному числу белка(ов) клетки-хозяина, которые являются нежелательной примесью, обнаруженной в белковых препаратах при производстве (т.е. генетической экспрессии) в клетках-хозяевах, обычно эукариотических клетках, таких как клетки CHO.

[0038] Термин «HRAM» относится к аналитической методике для характеристики полипептида, известной как точная масс-спектрометрия высокого разрешения.

[0039] Термин «ЖХ» относится к аналитической технике для характеристики полипептида, известной как жидкостная хроматография.

[0040] Термин «ЖХ-MC» относится к аналитической технике для характеристики полипептида, известной как жидкостная хроматография и масс-спектрометрия.

[0041] Термин «ЖХМС2» относится к аналитической технике для характеристики полипептида, известной как жидкостная хроматография и tandemная масс-спектрометрия.

[0042] Термин «длинноградиентная ЖХ» относится к аналитической методике для характеристики полипептида, известной как жидкостная хроматография, где длинный градиент относится к размеру колонки и времени пребывания, например, 50 см и 4 часа, соответственно.

[0043] Термин «mAb» относится к моноклональному антителу.

[0044] Термин «MS» относится к аналитической технике для определения характеристик полипептида, известной как масс-спектрометрия.

[0045] Термин «m/z» относится к аналитическому параметру для характеристики аспектов полипептида с помощью, например, MC, где «m» означает массу, а «z» означает зарядовое число наблюдаемых ионов.

[0046] Термин «NISTmAb» относится к стандарту моноклонального антитела, который известен как «стандарт моноклонального антитела National Institute of Standards & Technology Humanized IgG1_K (NISTmAb)».

[0047] Термин «Orbitrap» и «Exploris» относится к коммерчески доступным масс-спектрометрам, хорошо известным в области аналитической химии для определения характеристик полипептидов.

[0048] Термин «трипсиновый расщепитель или расщепление» относится к белку, который был подвергнут этапу расщепления, опосредованному ферментом трипсином. Расщепитель может быть сильно изменен концентрацией трипсина и временем инкубации для достижения желаемых результатов. В вариантах реализации изобретения трипсиновый расщепитель может быть «ультранизким расщепителем», например, в соотношении 10 000:1.

[0049] Термин «полипептидный расщепитель или пептидный расщепитель» относится к полипептиду или пептидной смеси, полученной в результате воздействия полипептида, например, антитела, как описано в настоящем документе, при инкубации с одним или несколькими ферментами (например, трипсином), способными расщепить более крупный белок или полипептидную последовательность, так что полипептиды или пептиды соответствующего размера могут быть опрошены с использованием иллюстративных способов, включая ULTLB.

[0050] Термин «ULTLB» является акронимом для трехэтапного анализа, называемого расщеплением с ультранизкой концентрацией трипсина, длинноградиентной жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией BoxCar.

[0051] Термин «расщепление с ультранизкой концентрацией трипсина» относится к низкому соотношению трипсина для достижения желательных пептидных профилей.

[0052] Если не определено иное, все термины и фразы, используемые в настоящем документе, включают значения, которые эти термины и фразы приобрели в данной области техники, если только обратное не указано ясно или не очевидно из контекста, в котором используется термин или фраза.

[0053] 2. Усовершенствованные способы для определения природы и численности HCPs в препарате терапевтического антитела

[0054] Описание предоставляет анализ, обычно состоящий из трех этапов:

[0055] Этап 1 включает подвергание образца терапевтического антитела, содержащего белки клетки-хозяина (HCPs), процессу расщепления с ультранизкой концентрацией трипсина;

[0056] Этап 2 включает подвергание полученных в результате расщепления полипептидов процессу жидкостной хроматографии с длинным градиентом; и

[0057] Этап 3 включает подвергание полипептидов, полученных на предыдущем этапе 2, процессу боксовой масс-спектрометрии, что приводит к значительному улучшению количества полипептидов, идентифицированных как по виду, так и по численности.

[0058] Иллюстративные способы и каждый этап описаны в многочисленных примерах ниже. Важно отметить, что иллюстративные анализы могут быть применены к нескольким терапевтическим антителам с превосходными результатами по сравнению с известными способами.

[0059] Вышеуказанные три этапа, т.е. расщепление с ультранизкой концентрацией трипсина, жидкостная хроматография с длинным градиентом и масс-спектрометрия VoхCar, обозначаются в данном документе аббревиатурой ULTLB и представлены в схематической форме на ФИГ. 1.

[0060] Примеры способов, описанных в настоящем документе, используют параметры, которые обеспечивают высокую точность при скорости и простоте использования. Примеры способов также позволяют проверять терапевтические препараты антител на наличие любых примесей НСР, чтобы обезопасить пациентов.

3. Широкое Применение

[0061] Следует оценить, что настоящее раскрытие обеспечивает быстрое и точное определение идентичности и количества белков клетки-хозяина (HCPs) в препарате терапевтического антитела с высокой точностью (в пределах около 0,1 ppm). Иллюстративные анализы были также применены к двум (2) примерным терапевтическим антителам (REGN mAb1 и REGN mAb2) с превосходными результатами (см. ФИГ. 6. верхняя панель и нижняя п

анель, соответственно). Соответственно, раскрытые способы дополняют и улучшают СМС (химию, производство и контроль) любого коммерчески производимого терапевтического антитела.

[0062] Например, в одном аспекте, иллюстративные анализы позволяют усовершенствовать производство и гарантировать гомогенность и чистоту ряда терапевтических антител.

[0063] Такие способы лечения антителами включают: абциксимаб, адалимумаб, адалимумаб-адбм, адалимумаб-атто, адо-трастузумаб эмтансин, алемтузумаб, алирокумаб, атезолизумаб, авелумаб, базиликсимаб, белиумаб, бенрализумаб, бевацизумаб, бевацизумаб-awwb, безлтоксумаб, блинатумомаб, брентуксимаб ведотин, бродалумаб, бурозумаб-твза, канакинумаб, капромаб пендетид, цертолизумаб пэгол, цетуксимаб, даклизумаб (Zenpax®), даклизумаб (Zinbryta®), даратумумаб, деносумаб, динутуксимаб, дупилумаб, дурвалумаб, экулизумаб, эрксикумаб, элотузумаб -аоое, эволокумаб, гемтузумаб озогамин, голимумаб, гуселкумаб, ибализумаб-уийк, ибритумомаб тиуксетан, идаруцизумаб, инфликсимаб, инфликсимаб-абда, инфликсимаб-duyb, инфликсимаб-qbtх, инотузумаб озогамин, ипилимумаб иксекизумаб, меполизумаб, натализумаб, нецитумумаб, ниволумаб, обилоксаксимаб, обинутузумаб, окрелизумаб, офатумумаб, оларатумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, эмбролизумаб, пертузумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксibaкумаб, реслизумаб, ритуксимаб, сарилумаб, секукинумаб, силтуксимаб, тилдракизумаб-асмн, тоцилизумаб, трастузумаб, трастузумаб-дкст, устекинумаб, ведолизумаб, а также ритуксимаб и гиалуронидазу.

[0064] Другие терапевтические антитела, представляющие интерес для различных показаний согласно анализа, включают: афлиберцепт для лечения заболеваний глаз; рилонацепт для лечения слепоты и метастатического колоректального рака; алирокумаб, для лечения семейной гиперхолестеринемии или клинического атеросклеротического сердечно-сосудистого заболевания (ASCVD); дупилумаб, для лечения атопического дерматита; сарилумаб, для лечения ревматоидного артрита и COVID-19; цемиплимаб, для лечения заболеваний, связанных с PD-1; и антитела для лечения лихорадки Эбола.

ПОЯСНЕНИЕ ПРИМЕРОМ

[0065] Приведенные ниже примеры приведены в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие описание, которое определяется прилагаемой формулой изобретения. Все ссылки и патенты, приведенные в настоящей заявке, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Материалы и способы

Ссылки

[0066] Способы настоящего описания, когда они практикуются специалистом в данной области, могут использовать обычные способы в области физической химии для анализа пептидов и белков, представленные в рамках описания, а также описанные в следующих ссылках и текущих электронных версиях, таких как «Introduction to Protein Mass Spectrometry» by Pradip Kumar Ghosh, 2015, «Analytical Characterization of Biotherapeutics» by Jennie R. Lill and Wendy Sandoval, 2017, «Mass Spectrometry of Proteins and Peptides: Methods and Protocols Second Edition (Methods in Molecular Biology)» by Mary S. Lipton and Ljiljana Pasa-Tolic, 2008, «Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research» by Alisa G. Woods and Costel C. Darie, 2019; и «Protein Analysis using Mass Spectrometry: Accelerating Protein Biotherapeutics from Lab to Patient» by Mike S. Lee and Qin C. Ji, 2017.

Материалы

[0067] Трифторуксусная кислота (TFA), муравьиная кислота (FA) и ацетонитрил были приобретены у Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL). Мочевина, йодоацетамид (IAM), трис(2-карбокси этил) фосфин гидрохлорид (TCEP-HCl) и стандарт гуманизированного моноклонального антитела IgG_κ RM 8671 были получены от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

[0068] Модифицированный трипсин класса секвенирования с буфером для ресуспендирования был получен от Promega (Madison, WI), а буфер Tris-HCl (уровень pH 7,5) был получен от Invitrogen (Carlsbad, CA). Колонки C18 SPE были получены от Waters (Milford, MA). Очищенные моноклональные антитела и белки CHO были произведены внутри компании Regeneron (Tarrytown, NY).

Нормальное расщепление

[0069] Образцы лекарственного вещества объемом 200 пг разбавляли до 5 мг/мл с использованием 9 М мочевины/100 mM Tris-HCl. Дисульфидные связи восстанавливали с

помощью 10 mM DTT и инкубировали в течение 30 мин при 50 °C. Образцы охлаждали до комнатной температуры и алкилировали 15 mM IAM в течение 30 мин в темноте.

[0070] Восстановленные и алкилированные образцы разбавляли примерно в 8 раз с помощью 100 mM Tris-HCl. Протеолитическое расщепление проводили с трипсином (соотношение трипсин: субстрат 1:20) в течение ночи при 37 °C. Расщепление гасили подкислением до 0,2% FA. Образцы обессоливали с помощью колонок Cl 8 SPE перед наноЖХ-МС/МС анализом.

Нативное расщепление

[0071] Подробное описание нативного расщепления представлено в публикации Huang et al.

2017 (Anal Chem 2017, 89 5435-5444). Вкратце, образцы разбавляли примерно до 5 мг/мл с использованием 50 mM Tris-HCl буфера, pH 8. Затем белки расщепляли трипсином (1:400 w/w соотношение фермента и субстрата) при 37°C в течение ночи с конечным уровнем pH около 7,4.

[0072] Затем дисульфидные связи восстанавливали с помощью 5 mM TCEP и инкубировали в течение 10 мин при 90°C. Полученные смеси пептидов подкисляли примерно до 0,2% FA и центрифугировали при 15000g в течение 2 мин. Супернатант переносили на центрифужные фильтры Amicon с отсечкой молекулярного веса (MWCO) 10 кДа для удаления частиц перед проведением наноЖХ-МС/МС анализа.

Расщепление с низкой концентрацией трипсина

[0073] Образцы обессоливали и заменяли буфер на 50 mM Tris-HCl буфер, pH 7,5, используя 10 кДа Amicon MWCO центробежные фильтры. Концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 от Thermo Scientific и разбавляли примерно до 5 мг/мл. Затем трипсин, разведенный в буфере для ресуспендирования (50 пг/пл), добавляли к образцам в соотношении 10000:1 w/w соотношение протеин:трипсин для расщепления при 37°C в течение ночи. Затем дисульфидные связи восстанавливали с помощью 5 mM TCEP и инкубировали в течение 10 мин при 90 °C. Образцы подкисляли до около 0,2% FA и центрифугировали при 15000g в течение 2 мин. Супернатант переносили на 10 кДа MWCO фильтры для удаления частиц перед проведением наноЖХ-МС/МС анализа.

НаноЖХ-МС/МС

[0074] Все образцы HCP анализировали с помощью системы UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific), соединенной с масс-спектрометром Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific). Система RSLCnano была оснащена 25 см или 50 см колонкой C18 (CoAnn Technologies, 360 мкм OD, 75 мкм ID, 10 мкм tip ID).

[0075] Мобильная фаза А содержала 0,1% FA в воде, а мобильная фаза В содержала 0,1% FA в 80% ацетонитрила/20% воды. Образцы загружали на предварительную колонку Acclaim PepMap 100, 75 мкм x 2 см (Thermo Scientific) в течение 5 мин при скорости потока 5 пл/мин. Для 2-часового градиента линейный градиент ЖХ был установлен

следующим образом: 5% В в 0 мин, 8% В в 8 мин, 36% В в 95 мин и 95% В от 115-120 мин.

[0076] Для градиента 4ч линейный градиент ЖХ устанавливали следующим образом: 5% В в 0 мин, 8% В в 10 мин, 36% В в 220 мин и 95% В от 235-240 мин. Скорость потока составляла 0,25 пл/мин для колонки 25 см и 0,2 пл/мин для колонки 50 см.

[0077] Сбор данных масс-спектров проводили с использованием Xcalibur v4.3 (Thermo Fisher Scientific, CA). Напряжение распыления нано ESI было установлено на 2200 В. В традиционном режиме сбора данных (DDA) в Orbitrap проводилось обзорное сканирование с длительностью цикла три секунды. Полное сканирование МС проводили в диапазоне m/z 380-1500 с разрешением 60K (m/z 200) со стандартной автоматической регулировкой усиления (AGC) 300% и максимальным временем инъекции 20 мс.

[0078] МС/МС фрагментацию проводили с использованием HCD с нормированной энергией столкновения 30% при разрешении 15K (m/z 200), 75% стандартной AGC и максимальном времени инъекции 50 мс. Продолжительность динамического исключения была установлена на 45 секунд с одним повторным отсчетом, и выбирали только прекурсоры с зарядовыми состояниями от +2 до +6.

Сканирование VoxCar на Exploris 480

[0079] Настройки сканирования VoxCar соответствовали настройкам, опубликованным Meier et al. Nat Methods 2018, 15, 440-448 с некоторыми изменениями. Общий цикл регистрации состоял из стандартного полного сканирования, а затем двух сканирований VoxCar, охватывающих диапазон m/z 400-1200 с длительностью цикла 1,5 с. Подходящие ионы-предшественники выбирались из предшествующего полного сканирования с применением тех же критериев и настроек, что и в традиционных экспериментах DDA.

[0080] Каждый VoxCar имеет 12 различных ячеек с различными окнами m/z . Для каждого сканирования VoxCar общее целевое значение AGC было скорректировано до 300% стандартного AGC и равномерно распределено по всем боксам. Для каждого из боксов максимальное общее время инъекции ионов составляло 20 мс. Все остальные параметры идентичны стандартному DDA, как описано ранее.

Анализ данных

[0081] Поиск в базе данных для идентификации белков HCP проводился с помощью SEQUEST и Mascot, встроенных в Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific) против базы данных белков SwissProt mouse target-decoy, которая включала общие контаминанты. Допуск массы иона-прекурсора был установлен на 20 ppm, а допуск массы фрагментного иона был установлен на 0,02 Da.

[0082] Трипсин был указан в качестве фермента для расщепления во время поиска в базе данных, при этом допускалось одно пропущенный гидролиз. Окисление метионина (+16 Da) было выбрано в качестве переменной модификации, а карбамидометилирование

цистеина было выбрано в качестве фиксированной модификации для нормальных (алкилированных) дайджестов.

[0083] Частота ложных обнаружений (FDR) была установлена на уровне 1% для идентификации пептидов и 5% для идентификации белков, с минимальным количеством 2 уникальных пептидов, обнаруженных для каждого белка.

Пример 1

Аспекты дизайна и усовершенствования анализа НСР для исследования терапевтических препаратов антител на чистоту

[0084] В этом примере описаны многие из проблем и решений конструктивных аспектов, рассмотренных при создании иллюстративных анализов для обнаружения НСР в препаратах терапевтических антител.

[0085] Сочетание высокоразрешающей ЖХ и чувствительных масс-спектрометров высокого разрешения с точным определением массы (HRAM) позволяет идентифицировать и количественно определять отдельные НСРs независимо от их иммуногенности. Основное препятствие в таких анализах возникает из-за огромной разницы в концентрации между большим количеством терапевтического антитела и отдельными НСР с низкой концентрацией (менее 1-100 нг НСР на мг терапевтического).

[0086] По мере развития стратегий очистки терапевтических антител динамический диапазон между терапевтическими и загрязняющими белками только увеличивался, и большинство НСР с низкой концентрацией, которые все еще могут обладать иммуногенной или ферментативной активностью, не могут быть обнаружены только прямым способом ЖХ-МС2.

[0087] В ответ на эту проблему было разработано множество способов пробоподготовки и инструментальных способов, которые: 1) уменьшают концентрационную пропасть между НСРs и терапевтическим белком за счет иммуноаффинности, белка А или отсекающей молекулярной массы, 2) уменьшают перекрывание пиков НСРs и терапевтических пептидов с помощью многомерной хроматографии, и 3) обходят внутрискановые ограничения динамического диапазона, которые препятствуют анализу данных, зависящих от видов, попадающих за нижний предел. (Henry, S. M. et al. MAbs 2017, 9, 1065-1075; Thompson, J. H. et al. Rapid Commun Mass Spectrom 2014, 28, 855-860; Madsen, J. A. et al. MAbs 2015, 7, 1128-1137; Chen, I. H. et al. Anal Chem 2020, 92, 3751-3757; Doneanu, C. E. et al. MAbs 2012, 4, 24-44; Farrell, A. et al. Anal Chem 2015, 87, 9186-9193; Kufer, R.; Haindl, M. et al. Anal Chem 2019, 91, 9716-9723; Walker, D. E. et al. MAbs 2017, 9, 654-663; Doneanu, C. E. et al. Anal Chem 2015, 87, 10283-10291; Kreimer, S. et al. Anal Chem 2017, 89, 5294-5302; Johnson, R. O. et al. Anal Chem 2020; Wang, Q. et al. Anal Chem 2020.)

[0088] Хотя некоторые из этих способов могут определять белковые загрязнения вплоть до sub-ppm, многие из них предпочтительно селективны по отношению к определенным НСР, значительно снижают производительность или повышают сложность идентификации новых белков. Поэтому относительно простые способы ЖХ-МС2,

которые существенно увеличивают глубину охвата НСР без внесения значительной погрешности или других ограничений, пользуются большим спросом в биофармацевтической промышленности и регулирующих органах.

[0089] Жидкостная хроматография, связанная с масс-спектрометрией (ЖХ-МС), является мощным инструментом для анализа белков клетки-хозяина (НСР) в процессе разработки лекарственных препаратов антител благодаря своей чувствительности, селективности и адаптивности. Однако огромный динамический диапазон между терапевтическим антителом и сопутствующими НСР представляет собой значительную проблему для обнаружения этих примесей с низкой концентрацией с помощью ЖХ-МС.

[0090] Для решения этой проблемы обычно проводится обогащение НСРs с помощью иммуоаффинного анализа, протеина А, 2D-ЖХ или других стратегий. Однако такое обогащение занимает много времени и иногда требует большого количества образца.

[0091] В настоящем документе раскрыта простая и чувствительная стратегия анализа НСРs в образцах терапевтических антител без громоздкого обогащения путем сочетания ультранизкой концентрации трипсина во время расщепления в неденатурирующих условиях, длинного хроматографического градиента и получения бокс-кара (ULTLB) с использованием квадрупольного орбитального масс-спектрометра.

[0092] Применение этой стратегии к стандарту моноклональных антител NIST (NISTmAb) привело к идентификации 453 мышинных НСРs, что значительно увеличивает количество идентифицированных НСРs без обогащения по сравнению с предыдущими отчетами. В очищенное лекарственное вещество антитела были введены известные количества ПГК, что продемонстрировало, что чувствительность способа составляет всего 0,1 ppm. Таким образом, способ ULTLB представляет собой чувствительную и простую платформу для глубокого профилирования НСРs в антителах.

[0093] Объединение достижений в области подготовки проб, ЖХ-разделения и сбора данных МС, вероятно, является ключом к разработке способов, способных проводить глубокое профилирование НСР без обычных препятствий. Одна из таких разработок предполагает преимущественное расщепление НСРs по сравнению с антителом путем использования неденатурирующих условий. (Huang, L. et al. *Anal Chem* 2017, 89, 5436-5444). В другом исследовании по протеомике, хотя оно и не применялось к НСРs, наблюдалось улучшенное обнаружение белков с низкой концентрацией, благодаря применению чрезвычайно низкой концентрации трипсина (соотношение фермента и субстрата 1:25000 w/w) во время расщепления (Fonslow, B. R. et al. *Nat Methods* 2013, 10, 54-56).

[0094] Исследования в области протеомики, касающиеся длины колонок и градиентов ЖХ, показали, что более длинные колонки и градиенты обеспечивают чувствительное и глубокое покрытие протеома без дополнительной пробоподготовки и обременительных временных требований многомерной ЖХ (Thakur, S. S. et al. *Mol Cell Proteomics* 2011, 10, M110 003699; Hinzke, T. et al. *Front Microbiol* 2019, 10, 238).

[0095] Наконец, новый способ сбора данных для масс-спектрометров Orbitrap, названный способом «BoxCar», уменьшает проблемы внутрисканового динамического диапазона, характерные для сбора данных MSI с полным сканированием во время DDA, путем заполнения С-ловушки ионами из узких m/z окон и последовательной передачи этих пакетов на Orbitrap, где они анализируются за одно сканирование. (Meier, F. et al. *Nat Methods* 2018, 15, 440-448). Способ BoxCar дает ионам с низким ионным током больше времени на получение и может увеличить соотношение сигнал/шум на целый порядок величины за счет ограничения пространства, которое ионы с высоким ионным током занимают в ловушке.

[0096] В данном исследовании изучение нескольких колонок и длин градиентов показало, что более длинные колонки и градиенты максимизируют идентификацию HCP, а получение способом BoxCar позволило идентифицировать больше HCP, чем обычный DDA. Более того, сочетая сверхнизкую концентрацию трипсина во время расщепления в неденатурирующих условиях с длинным хроматографическим градиентом и масс-спектрометрией BoxCar на квадрупольном орбитальном масс-спектрометре, была создана простая и новая платформа для глубокого профилирования HCP. Этот простой, надежный и быстрый протокол, названный в данном документе способом «ULTLB», позволяет проводить гораздо более глубокое профилирование HCPs по сравнению с другими способами, поскольку способ ULTLB исключает ненужные дополнительные этапы обогащения образца, отнимающие много времени.

[0097] Как раскрыто в данном документе, изучение нескольких колонок и длин градиентов показало, что более длинные колонки максимизируют идентификацию HCP, а получение BoxCar позволило выявить больше HCP, чем обычный DDA. Более того, сочетая сверхнизкую концентрацию трипсина во время расщепления в неденатурирующих условиях с длинным хроматографическим градиентом и масс-спектрометрией BoxCar на квадрупольном орбитальном масс-спектрометре, было установлено, что необходима простая и новая платформа для глубокого профилирования HCPs.

[0098] Названный способ «ULTLB», этот простой, надежный и быстрый протокол, который обеспечивает гораздо более глубокое профилирование HCPs по сравнению с другими способами и избавляет от ненужных дополнительных этапов обогащения образца, отнимающих много времени (см. ФИГ. 1, пример 6 и таблицу 2). Как изображено на ФИГ. 1, анализ по данному описанию идентифицировал 296 полипептидов. Chen et al. идентифицировали только 104 полипептида. Huang et al. идентифицировали только 43 полипептида.

[0099] Соответственно, в данном примере изложены проблемы обнаружения HCP и приведены различные параметры примерных анализов, описанных в данном документе (способы с использованием ULTLB), которые значительно улучшают обнаружение HCP, как более подробно описано ниже.

Пример 2

Дизайн анализа и результаты, относящиеся к этапу 1 трехэтапного анализа:

Этап расщепления трипсином

[00100] В данном примере описаны аспекты дизайна иллюстративных анализов для обнаружения НСР в препаратах терапевтических антител, начиная с первого из трех этапов анализа: Этап расщепления трипсином.

[00101] Был разработан простой и чувствительный способ подготовки образца без этапов обогащения с использованием новой стратегии расщепления. Этот этап расщепления включал использование ультранизкой концентрации трипсина в неденатурирующих условиях, что привело к преимущественному расщеплению НСР, а не самого mAb.

[00102] mAb, которое обычно намного больше большинства НСР и стабилизировано в общей сложности 16 дисульфидными связями, менее доступно для трипсина, чем НСР, и легко расщепляется в восстановительных условиях или при относительно высоких уровнях протеазы. Для получения оптимальных условий расщепления использовали различные соотношения протеин:трипсин от 25000:1 до 1000:1 были протестированы путем расщепления NISTmAb в неденатурирующих условиях.

[00103] Все образцы анализировали на колонке диаметром 25 см с градиентом 2 ч.: ФИГ. 2 показывает, что больше НСР и уникальных пептидов было идентифицировано из дайджестов с соотношением протеин:трипсин 10000:1 и 2500:1 по сравнению с расщепителями с соотношениями протеин:трипсин 25000:1 и 1000:1. Дальнейший анализ показал, что количество идентифицированных пептидных спектров mAb увеличивалось в несколько раз с увеличением концентрации трипсина (около 1000 против около 4200).

[00104] Относительно мало спектров mAb было идентифицировано в образцах расщепления с ультранизкой концентрацией трипсина (25000:1 и 10000:1), что указывает на то, что в этих образцах было переварено минимальное количество mAb. Путем сравнения количества идентифицированных НСР с количеством обнаруженных пептидных спектров mAb, соотношение протеин:трипсин 10000:1 было выбрано в качестве оптимального соотношения протеин:трипсин при котором было обнаружено наибольшее количество НСР и минимальное количество mAb было расщеплено.

[00105] Для сравнения этого способа с обычным и нативным расщеплением образцы, приготовленные при каждом условии, анализировались с использованием одинаковых условий ЖХ-МС. Как изображено на ФИГ. 2, способ расщепления трипсином сверхнизкой концентрации значительно улучшает идентификацию НСР (на 68% на уровне белков и на 60% на уровне пептидов) по сравнению со способом нативного расщепления. Оба способа показали значительно лучшие результаты по сравнению с обычным расщеплением, которое выявило лишь несколько НСР и пептидов.

[00106] Основной причиной снижения обнаружения НСР является высокая концентрация расщепленных пептидов антител, которые доминировали на хроматограмме ЖХ в образцах нормального расщепления и по-прежнему высоко содержатся в образцах нативного расщепления. Однако образцы для расщепления с ультранизкой концентрацией

трипсина имеют низкое количество расщепленных пептидов mAb и, следовательно, меньшую интерференцию пептидов НСР.

[00107] Результаты показывают, что раскрытое расщепление с ультранизкой концентрацией трипсина является простым способом селективного расщепления пептидов НСР с низкой концентрацией, сохраняя mAb интактными во время подготовки образца без дополнительных и утомительных процедур обогащения. См. ФИГ. 2А и 2В.

[00108] Соответственно, в данном примере изложены проблемы обнаружения НСР и приведены различные параметры иллюстративных анализов, описанных в настоящем документе (анализы с использованием ULTLB), которые значительно улучшают первый из трех этапов анализа: Этап расщепления трипсином.

Пример 3

Дизайн анализа и результаты, относящиеся к этапу 2 трехэтапного анализа:

Этап длинноградиентной жидкостной хроматографии

[00109] В данном примере описаны аспекты дизайна иллюстративных анализов для обнаружения НСР в препаратах терапевтических антител, начиная со второго из трех этапов анализа: Этап длинноградиентной жидкостной хроматографии.

[00110] Для оптимизации ЖХ и улучшения идентификации НСР, ряд колонок различной длины и размеров от нескольких компаний были протестированы для получения наилучшего разделения с использованием образцов НСР NISTmAb (данные не показаны). Колонки с наилучшими показателями (CoAnn Technologies, LLC, 1,7 мкм, колонка C18) впоследствии использовались для дальнейшей оптимизации длины колонок и градиентов с использованием образцов нативного расщепления NISTmAb. Данные экспериментов по оптимизации длины колонки показали, что использование колонки 50 см позволяет получить на 44,2% больше НСР и на 36,0% больше уникальных пептидных identifications по сравнению с колонкой 25 см при использовании 2-часового градиента (ФИГ. 2).

[00111] Превосходство колонки длиной 50 см объясняется более сильным разделением и более узкой шириной пика. Длина градиента была дополнительно оптимизирована на колонке 50 см. Мы обнаружили, что идентификация НСР может быть улучшена на 14,7% на уровне белков и на 13,5% на уровне пептидов при использовании градиента продолжительностью 4 часа по сравнению с градиентом продолжительностью 2 часа. Однако еще более длительные градиенты (6 ч и 8 ч) были протестированы на той же колонке, и дальнейшего улучшения не наблюдалось. Хотя исследования в области протеомики показали, что 8-часовые градиенты показали лучшие результаты по сравнению с 4- или 6-часовыми градиентами в сложных образцах тканей или клеток, 35,36 преимущества использования градиентов аналогичной длины, по-видимому, уменьшаются при анализе образцов НСР, поскольку они менее сложны и имеют необычно высокую концентрацию одного белка (mAb), который мешает анализу пептидов с низкой концентрацией НСР.

[00112] Кроме того, сигнал МС пептидов с низкой концентрацией НСР может значительно уменьшиться из-за увеличения ширины пика в более длинных градиентах, таких как 6 или 8 часов. Эти наблюдения заставили нас выбрать градиент 4 ч на колонке 50 см в качестве оптимального условия ЖХ. Примерно на 65,5% больше НСР (187 против 113) и на 54,4% больше уникальных пептидов (772 против 500) было идентифицировано в образцах нативного расщепления NISTmAb при использовании градиента 4 ч и колонки 50 см вместо более короткого разделения 2 ч на колонке 25 см (ФИГ. 2). Сочетание такого оптимального ЖХ-разделения с нашим расщеплением с ультранизкой концентрацией трипсина приводит к более чем трехкратному увеличению числа идентифицированных НСР по сравнению с нативным расщеплением при стандартных условиях ЖХ (366 против 113). См. ФИГ. 2А и 2В.

[00113] Соответственно, в данном примере изложены проблемы обнаружения НСР и приведены различные параметры иллюстративных анализов, описанных в настоящем документе (анализы с использованием ULTLB), которые значительно улучшают второй из трех этапов анализа: Этап длинноградиентной жидкостной хроматографии.

Пример 4

Дизайн анализа и результаты, относящиеся к этапу 3 трехэтапного анализа:

Этап жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) VoxCar

[00114] В данном примере описаны аспекты дизайна иллюстративных анализов для обнаружения НСР в препаратах терапевтических антител, начиная с третьего из трех этапов анализа: этап жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) VoxCar

[00115] Основной проблемой для способов, основанных на ЖХ-МС, является то, что разница в концентрации между НСР и терапевтическим антителом в дайджесте образца может составлять более шести порядков величины. Кроме того, ключевым ограничением масс-спектрометров на основе ловушек является ограниченная емкость заряда ионной ловушки, что исключает многие ионы с низкой концентрацией из анализа на уровне MSI. Для облегчения проблемы широкого динамического диапазона, затрудняющего анализ НСР, способ получения VoxCar был адаптирован к анализу образцов НСР для увеличения динамического диапазона обнаружения.

[00116] Как показано на ФИГ. 3А и 3В, суммарное время ввода ионов при сканировании VoxCar (164,6 мс) было намного больше, чем время ввода ионов при стандартном полном сканировании (1,3 мс), а среднее время ввода ионов в отдельных боксах было более чем в 10 раз выше, чем при стандартном полном сканировании. Конечным результатом было увеличение сигнала полного сканирования малоизбыточных видов с плохим отношением сигнал/шум (S/N) более чем в 40 раз.

[00117] В рамках одного эксперимента ЖХ-МС количество сканирований VoxCar и количество ячеек в каждом сканировании VoxCar было фиксированным. Общий цикл регистрации состоял из стандартного полного сканирования и двух или более сканирований VoxCar, охватывающих диапазон m/z 400-1200. Большее количество сканирований VoxCar и большее количество боксов в одном сканировании может

увеличить динамический диапазон обнаружения, но при этом требуется большее время цикла.

[00118] Чтобы сбалансировать общее время цикла и количество сканирований VoxCar, было исследовано несколько настроек VoxCar. Наибольшее количество identifications HCP было получено при использовании одного полного сканирования плюс два сканирования VoxCar. Подробные окна m/z для каждой ячейки в двух сканированиях VoxCar представлены в таблице 1.

[00119] После оптимизации настроек VoxCar, получение VoxCar сравнивали с DDA, используя образцы нативного расщепления NISTmAb, разделенные при идентичных условиях ЖХ (градиент 2 часа на колонке 25 см). 171 HCP был идентифицирован с использованием способа VoxCar, что представляет собой улучшение примерно на 51% по сравнению с традиционным DDA, а количество уникальных пептидов увеличилось примерно на 55% (ФИГ. 3С).

[00120] Соответственно, в данном примере изложены проблемы обнаружения HCP и приведены различные параметры примерных анализов, которые значительно улучшают второй из трех шагов анализа: этап жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) VoxCar.

Пример 5

Дизайн анализа и результаты комбинированного трех (3) ступенчатого анализа

Способ ULTLB

[00121] В данном примере описаны аспекты дизайна иллюстративных анализов для обнаружения HCPs в препаратах терапевтических антител, объединяя все три этапа анализа:

[00122] Соответственно, все этапы вышеприведенных иллюстративных анализов были объединены, т.е.: расщепление при сверхнизкой концентрации трипсина в неденатурирующих условиях, оптимальный длинный градиент ЖХ и получение VoxCar в новый способ, названный «способ ULTLB», который был применен к стандартному антителу (NISTmAb) для прямого сравнения с другими отчетами. Способ ULTLB идентифицировал в общей сложности 453 мышинных белка (полный список идентифицированных HCP см. в Таблице 1).

[00123] Как изображено на ФИГ. 4А, способ ULTLB увеличил количество идентифицированных HCP более чем в четыре раза по сравнению со стандартным нативным расщеплением, проанализированным с использованием 2-часового градиента на колонке диаметром 25 см. Результаты также показывают, насколько каждая оптимизация, включая пробоподготовку, ЖХ и получение МС, способствовала улучшению идентификации HCP, где более длинная колонка (50 см), более длительный градиент (4 ч) и получение в VoxCar улучшили идентификацию HCP на 44%, 14% и 38%, соответственно. При сочетании расщепления с ультранизкой концентрацией трипсина с

оптимизированными условиями ЖХ-МС, идентификация НСР еще больше увеличилась более чем на 75%.

[00124] Это указывает на то, что расщепление с ультранизкой концентрацией трипсина значительно улучшило количество идентификаций НСР в способе ULTLB. Недавно, оба Chen et al. (Anal Chem 2020, 92, 3751-3757) и Huang et al. (Anal Chem 2017, 89, 5436-5444) разработали стратегии идентификации НСР и проверили их эффективность с помощью NISTmAb, идентифицировав 164 НСР и 60 НСР, соответственно. Кроме того, 57 из 60 ПГК, выявленных способом нативного расщепления (Huang et al.), были идентифицированы способом ULTLB, а 147 из 164 ПГК, выявленных способом MWCO, были аналогичным образом охвачены способом ULTLB. В целом, способом ULTLB было идентифицировано 296 НСР мыши в NISTmAb, о которых не сообщалось в предыдущих двух исследованиях (ФИГ. 4В).

Таблица 1

Проверка предела обнаружения путем изменения концентрации белков в образце антитела

Финальное введение ppm	Название белка	Код доступа	# идентифици- рованных PSM	# уникальных пептидов	MW [kDa]
200	Бета- гексозаминидаза	G3HYN7	386	21	60,1
100	комплеммент C1r-A субкомпонент	G3GUR1	566	25	80
50	hPLBD2	G316T1	332	10	65,5
20	катепсин Z	Q9EPP7	160	10	34
10	сиалат О- ацетилэстераза	G311B1	32	5	61,4
10	катепсин D	G314W7	318	14	44,1
5	Металлопротеиназа ингибитор 1	G31BH0	49	6	22,4
5	пептидил-пролил цис-транс изомераза	G3H533	203	17	23,6
5	лизосомальная кислотная липаза	G3HXY6	148	8	45,6
1	с-х-с мотив хемокина	A0A061IN B9	28	2	39,7
1	транстеиретин	G314M9	40	5	15,8
0,5	кислотная церамидаза	G3GZB2	17	3	44,7
0,1	проколлаген С эндопептидаза энхансер 1	G3I664	8	1	55,2

[00125] Чтобы оценить предел обнаружения способа, 13 очищенных белков СНО в концентрациях от 0,1 до 200 ppm были добавлены в очищенное коммерческое моноклональное антитело mAb1, содержащее очень низкий уровень эндогенных НСР (Таблица 1).

В список были включены такие важные мишени с низкой концентрацией НСР, как PLBD2, катепсин D, ингибитор металлопротеиназы 1 и другие. На ФИГ. 6 для сравнения результатов, полученных для двух (2) моноклональных антител.

[00126] Образцы для анализа были обработаны и проанализированы в трех экземплярах с использованием способа ULTLB. Таблица 1 показывает, что все 13 белков были идентифицированы с высокой достоверностью, и даже белок самой низкой концентрации (0,1 ppm) был идентифицирован с помощью восьми спектров. Результаты показывают, что способ ULTLB является чувствительным и может обнаруживать НСРs вплоть до 0,1 ppm.

[00127] Воспроизводимость способа ULTLB также оценивалась в двух отдельных пробах с использованием NISTmAb, и в общей сложности 583 белка, что составляет 92% от всех белков, были общими между пробами (ФИГ. 5A). Этот воспроизводимый результат указывает на высокую степень уверенности в идентификации белков, что очень важно для анализа НСР. Обилие белков также было определено количественно с помощью безметочной количественной оценки и сравнивалось в обоих пробах. Корреляция Пирсона для этого способа составила более 0,95, что указывает на высокую воспроизводимость способа ULTLB (ФИГ. 5B).

[00128] Соответственно, в данном примере изложены проблемы обнаружения НСР и приведены различные параметры и результаты данных трехэтапного способа ULTLB.

Пример 6

Сравнительный анализ пяти (5) различных аналитических способов НСР

[00129] В данном примере представлен сравнительный анализ пяти (5) различных аналитических способов НСР, представленных в таблице 2.

[00130] Данное описание устанавливает простую и новую платформу для глубокого профилирования НСРs, названную способом ULTLB, сочетая ультранизкую концентрацию трипсина во время расщепления в неденатурирующих условиях, длинный хроматографический градиент и получение масс-спектрометрии VoxCap на квадрупольном масс-спектрометре Орбитрап.

[00131] Используя эту стратегию, НСРs с низкой концентрацией в образцах mAb предпочтительно расщеплялись с использованием ультранизкой концентрации трипсина в неденатурирующих условиях, оставляя mAb относительно неповрежденными и позволяя удалить их с помощью денатурации или фильтра MWCO. Оптимизация длинного градиентного разделения и получение VoxCap дополнительно улучшили динамический диапазон обнаружения НСР на 1-2 порядка.

[00132] Эксперименты с введением демонстрируют высокую чувствительность способа ULTLB, достигая предела обнаружения до 0,1 ppm. Способ ULTLB также

обнаружил более 450 HCPs в NISTmAb с высокой воспроизводимостью, включая почти все идентифицированные HCPs, о которых ранее сообщалось другими способами.

[00133] Таким образом, способ ULTLB является простым, надежным и позволяет гораздо глубже профилировать HCP по сравнению с другими способами и избавляет от дополнительных трудоемких этапов обогащения образца.

Таблица 2

Сравнение анализов HCP для определения чистоты терапевтических антител

НСП Способы Анализа	Время для подготовки образца	Доп. Реагенты/ Необходимые Материалы	Количество образца (мг)	Чувствитель- ность	HCP IDs в NIST mAb
IP Pull Down	+++++	Вкрапления антител	около 10	около 10	н/п
Протеин А+нативное расщепление +FAIMS	+++++	Вкрапления Протеина А	около 10	около 10	610
нативное расщепление	++	W/O	около 10	около 10	60
MF срез	+++++	50К фильтр и центрифуга	около 10	около 10	165
Новый способ	++	W/O	около 10	около 10	453

[00134] Соответственно, в данном примере представлен анализ четырех (4) ранее существовавших анализов для обнаружения HCP по сравнению с иллюстративными анализами (с использованием ULTLB), показывающий, что ULTLB превосходит их.

Другие варианты реализации изобретения

[00135] Хотя в вышеприведенной спецификации описаны некоторые варианты осуществления и примеры, а многие детали приведены для наглядности, специалистам в данной области будет очевидно, что описанные иллюстративные анализы могут иметь дополнительные варианты реализации и что некоторые детали, описанные в данном документе, могут быть изменены без отступления от основных принципов, описанных в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения идентичности или количества контаминирующего белка в терапевтическом образце белка, включающий:

расщепление образца белка, при котором получается меньшая полипептидная последовательность; подвержение указанного лизата хроматографическому этапу; и

подвержение полученного на этапе хроматографии лизата масс-спектрометрии (МС), при этом определяется идентичность или количество контаминирующего белка.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что идентичность контаминирующего белка определяют по размеру или последовательности.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что количество контаминирующего белка определяют на уровне частей на миллион (ppm) менее 10, менее 5, менее 2, менее 1 или менее 0,1.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что контаминирующий белок представляет собой белок клетки-хозяина (HCP).

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что терапевтический белок представляет собой антитело, вариант антитела или слияние антител.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что расщепление представляет собой расщепление с низкой концентрацией трипсина.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что жидкостная хроматография представляет собой длинноградиентную жидкостную хроматографию.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометрия (МС) представляет собой BoxCar.

9. Способ определения идентичности или количества контаминирующего белка клетки-хозяина (HCP) в образце терапевтического антитела, включающий:

воздействие на образец белка ультранизкой концентрацией трипсина для получения белкового лизата;

воздействие на указанный лизат длительным этапом градиентной жидкостной хроматографии; и воздействие на лизат на этапе хроматографии масс-спектрометрии (МС) BoxCar, при этом определяется идентичность или количество контаминирующего белка HCP.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что полипептид представляет собой антитело, вариант антитела или слияние антител.

11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что контаминирующий белок выбран из группы, состоящей из бета-гексозаминидазы, субкомпонента комплемента C1r-A, hPLBD2, катепсина Z, катепсина D, сиапат О-ацетилэстеразы, ингибитора металлопротеиназы 1, пептидил-пролил цис-транс-изомеразы, лизосомальной кислой липазы, хемокина c-x-c motif, транстеиретина, кислой церамидазы и усилителя эндопептидазы проколлагена C 1.

12. Способ по любому из пп. 9-11, отличающийся тем, что трипсин-опосредованное расщепление происходит в соотношении 10000: 1.

13. Способ по любому из пп. 9-12, отличающийся тем, что этап длинноградиентной жидкостной хроматографии включает колонку диаметром 50 см и градиент 4 ч.

14. Способ по любому из пп. 10-13, отличающийся тем, что антитело, вариант антитела или слияние антител выбрано из группы, состоящей из афоберцепта, рилонасепта, алирокумаба, дупилумаба, сарилумаба, цемиплимаба и антител против Эболы.

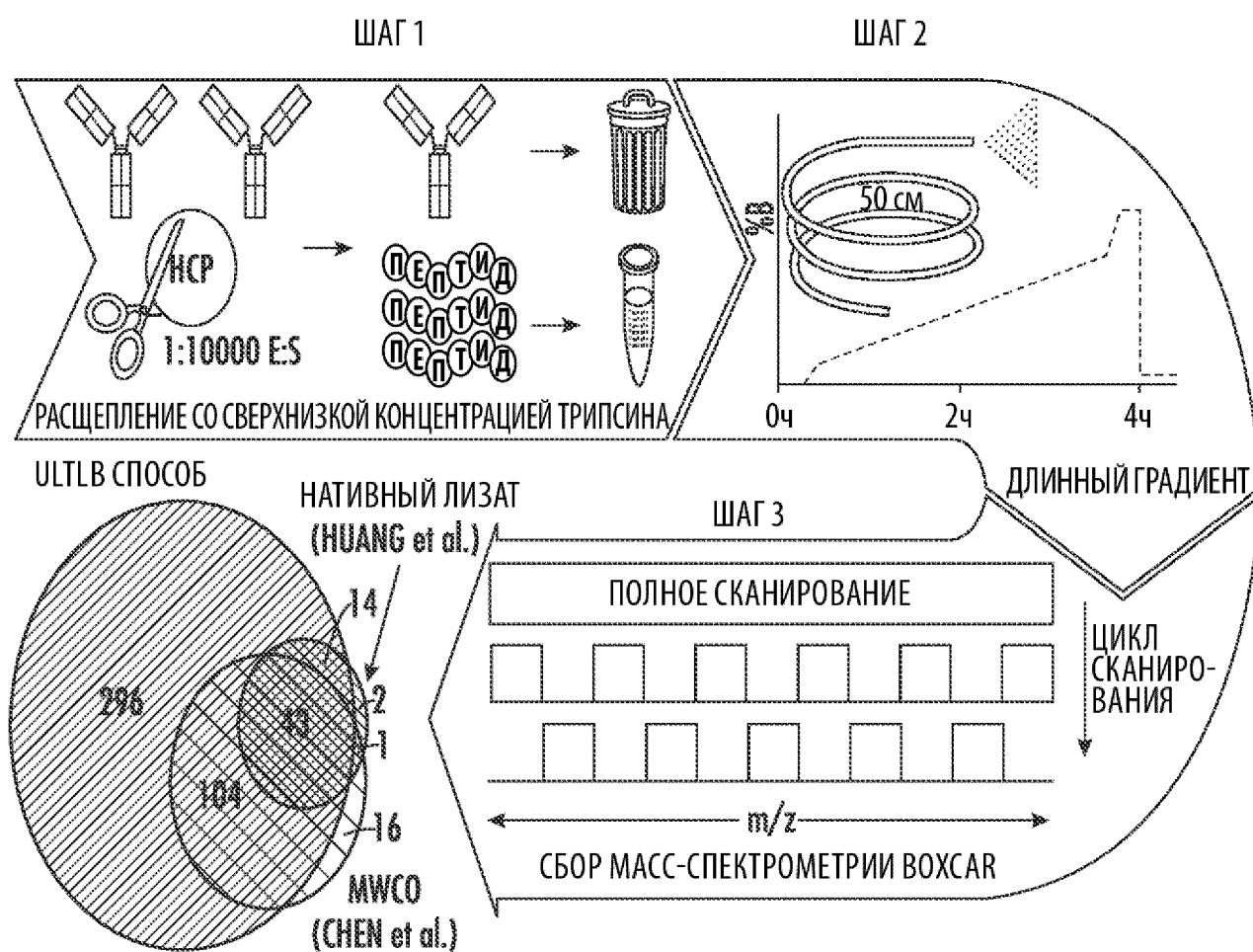
15. Полипептид, определяемый как контаминирующий белок клетки-хозяина (HCP) на уровне частей на миллион (ppm) менее 10, менее 5, менее 2, менее 1 или менее 0,1 в соответствии со способом по п. 9.

16. Полипептид по п. 15, отличающийся тем, что полипептид выбран из группы, состоящей из антитела, варианта антитела и слияния антител.

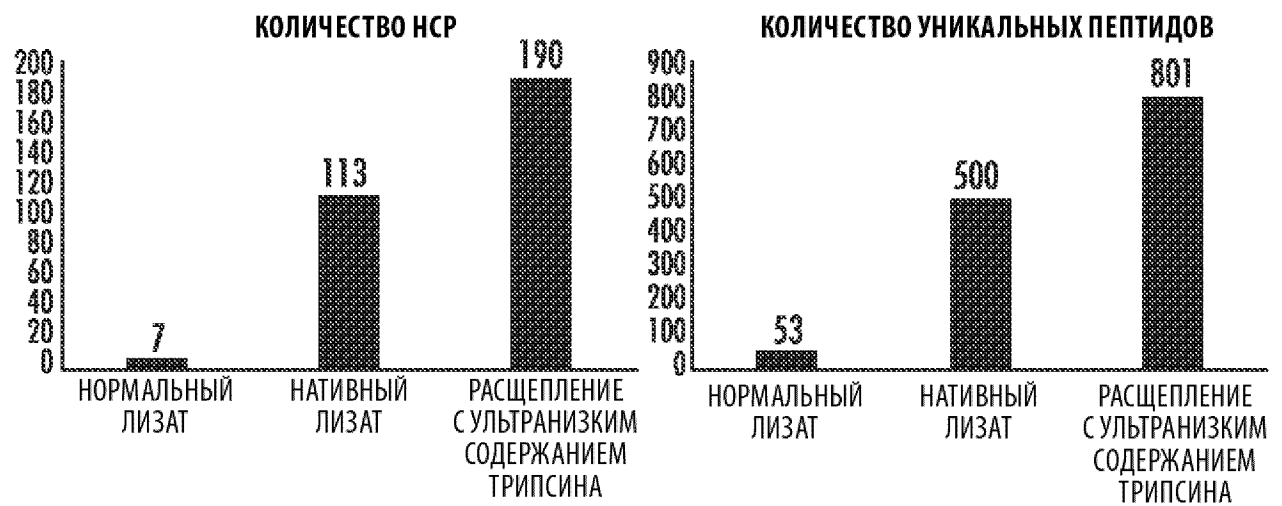
17. Полипептид по п. 15, отличающийся тем, что полипептид выбран из группы, состоящей из афлиберцепта, рилонасепта, алирокумаба, дупилумаба, сарилумаба, цемиплимаба и антитела против Эболы.

18. Полипептид по п. 15, отличающийся тем, что полипептид представляет собой афлиберцепт.

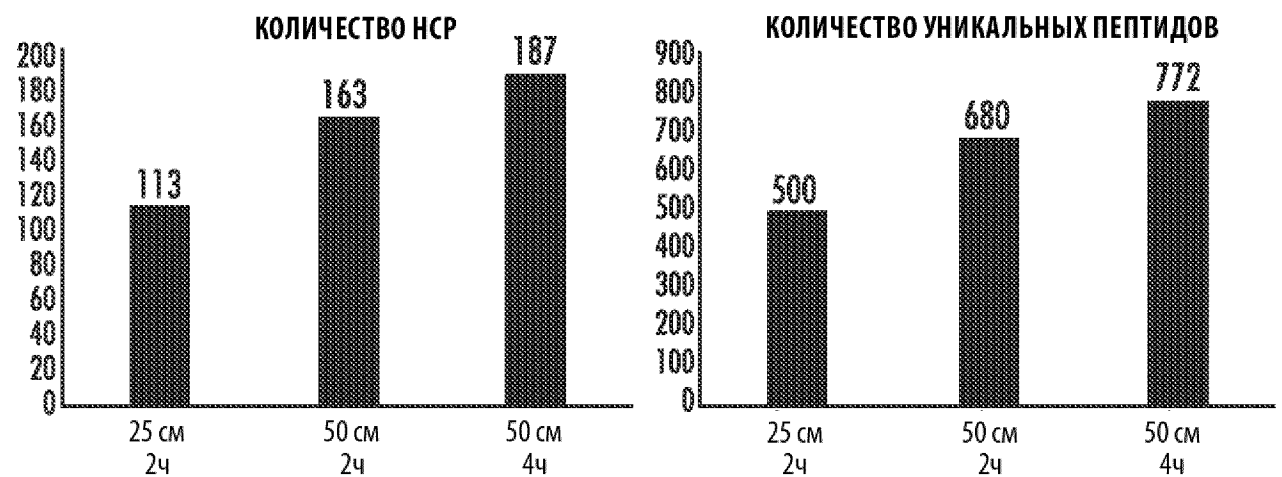
По доверенности



Фиг. 1

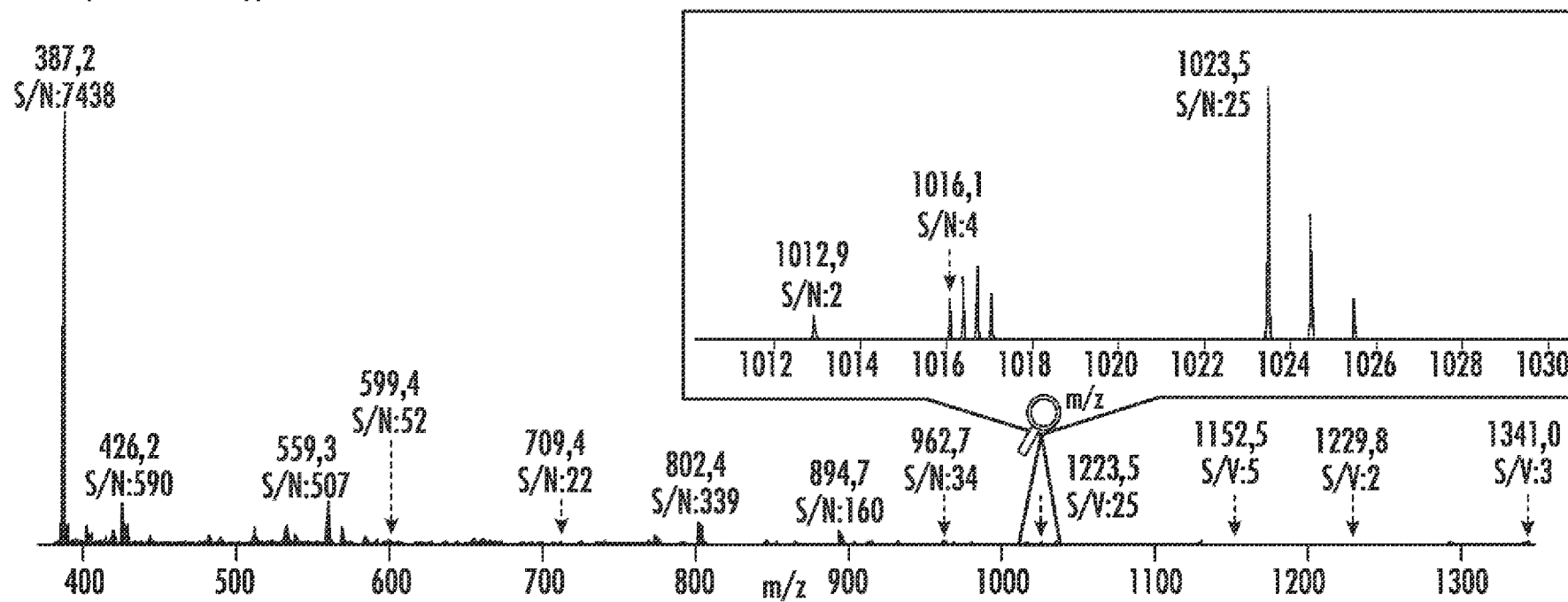


Фиг. 2А



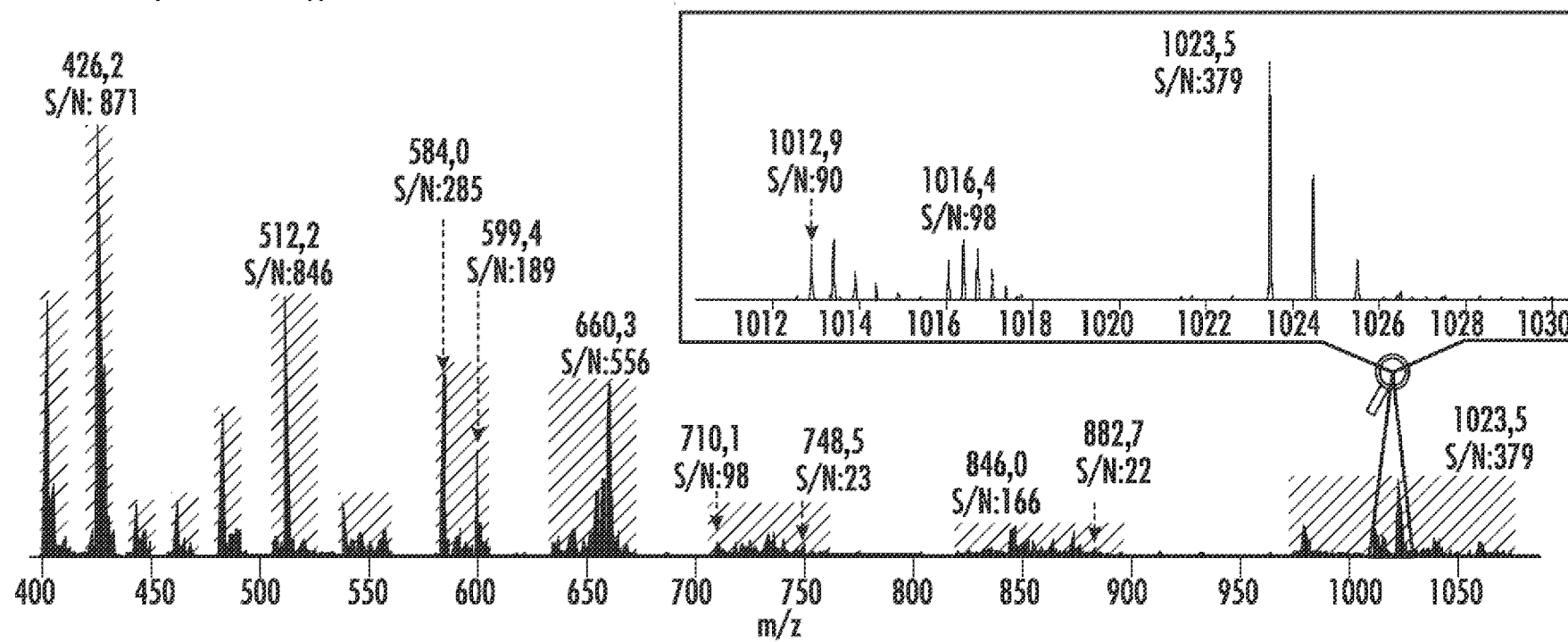
Фиг. 2В

ОБЩЕЕ ВРЕМЯ ВВОДА ИОНОВ ПРИ ПОЛНОМ СКЕНИРОВАНИИ: 1,3 мс

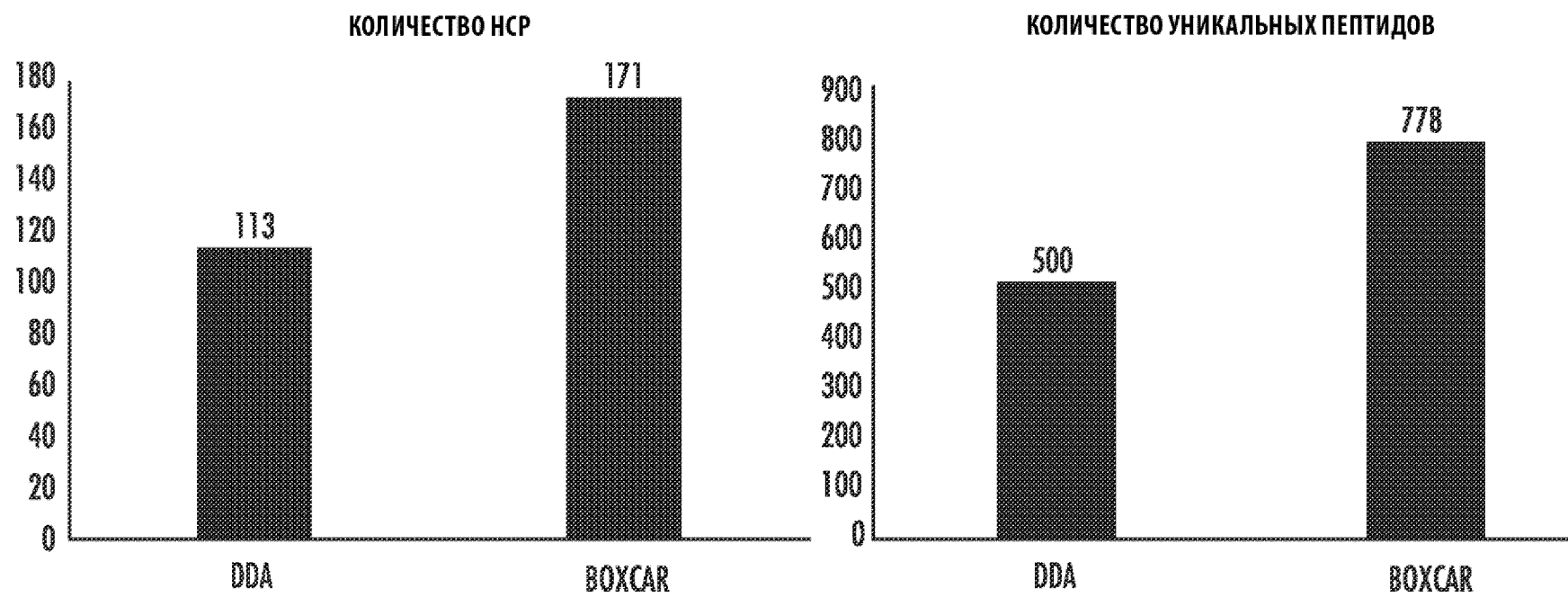


Фиг. 3А

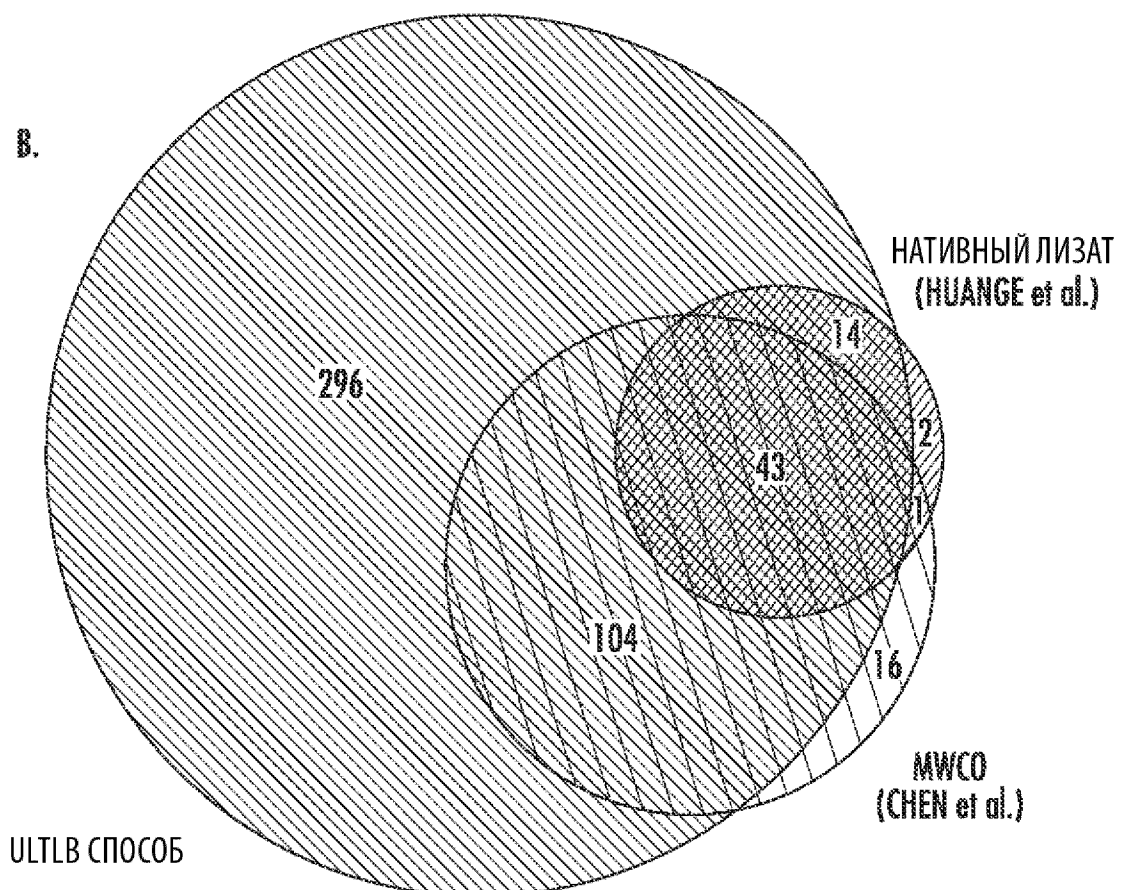
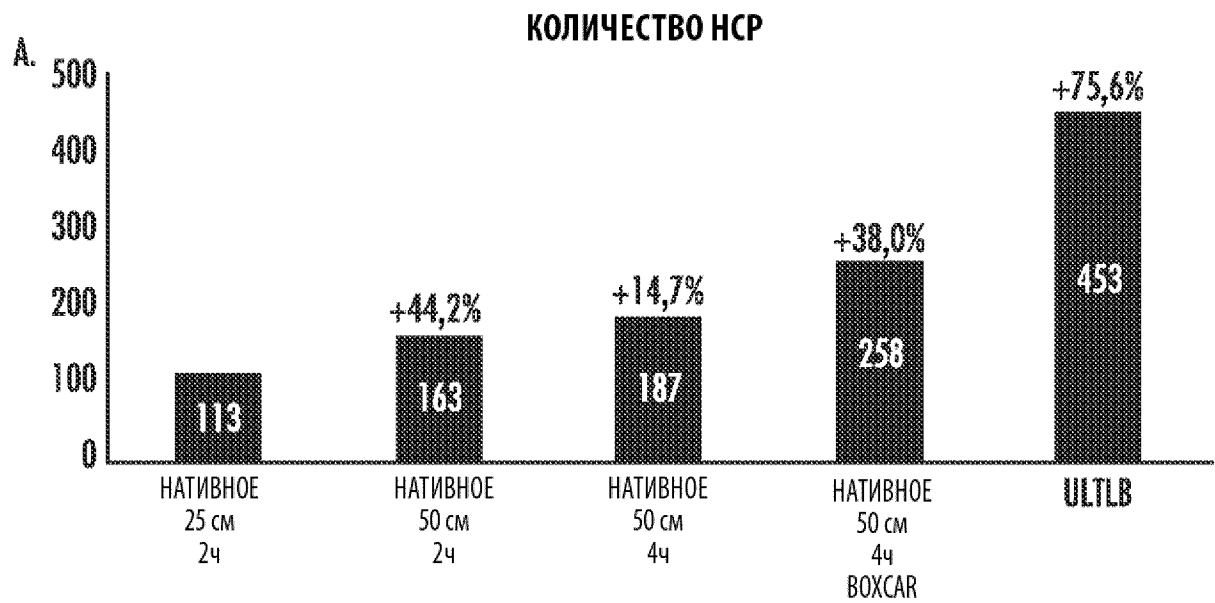
ОБЩЕЕ ВРЕМЯ ВВОДА ИОНОВ ПРИ СКАНИРОВАНИИ VOXCAR: 164,6 мс



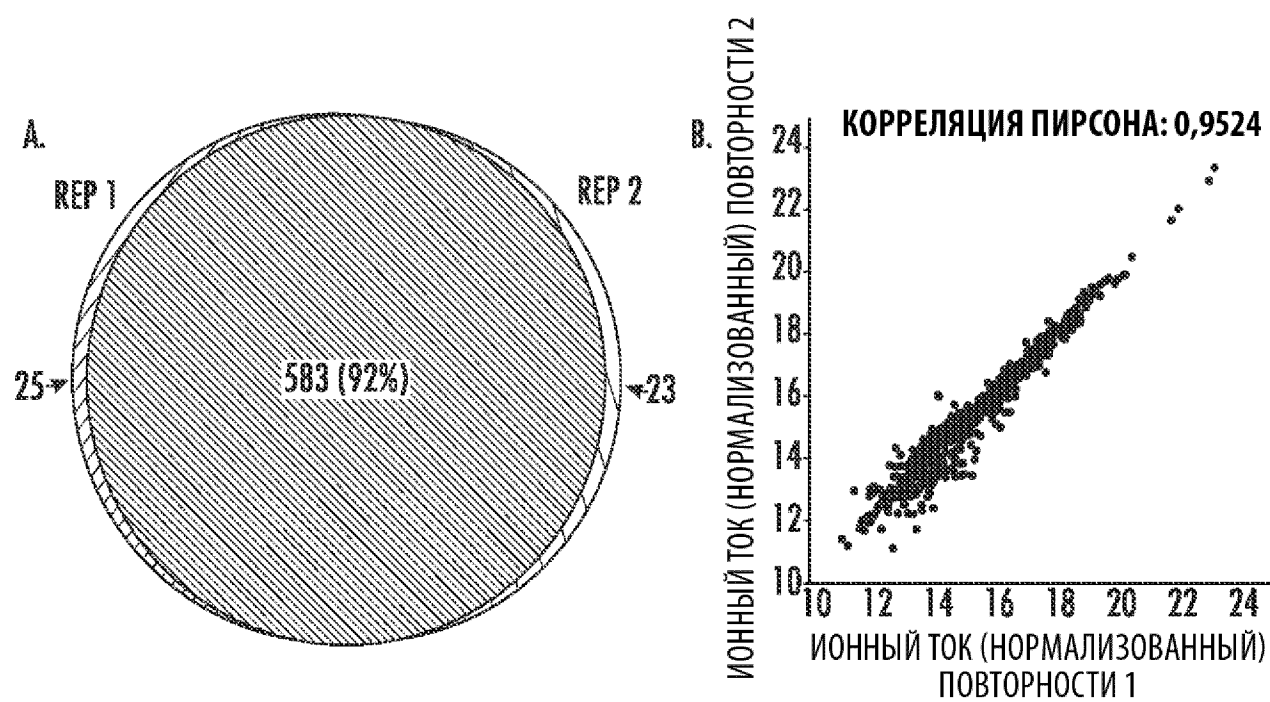
Фиг. 3В



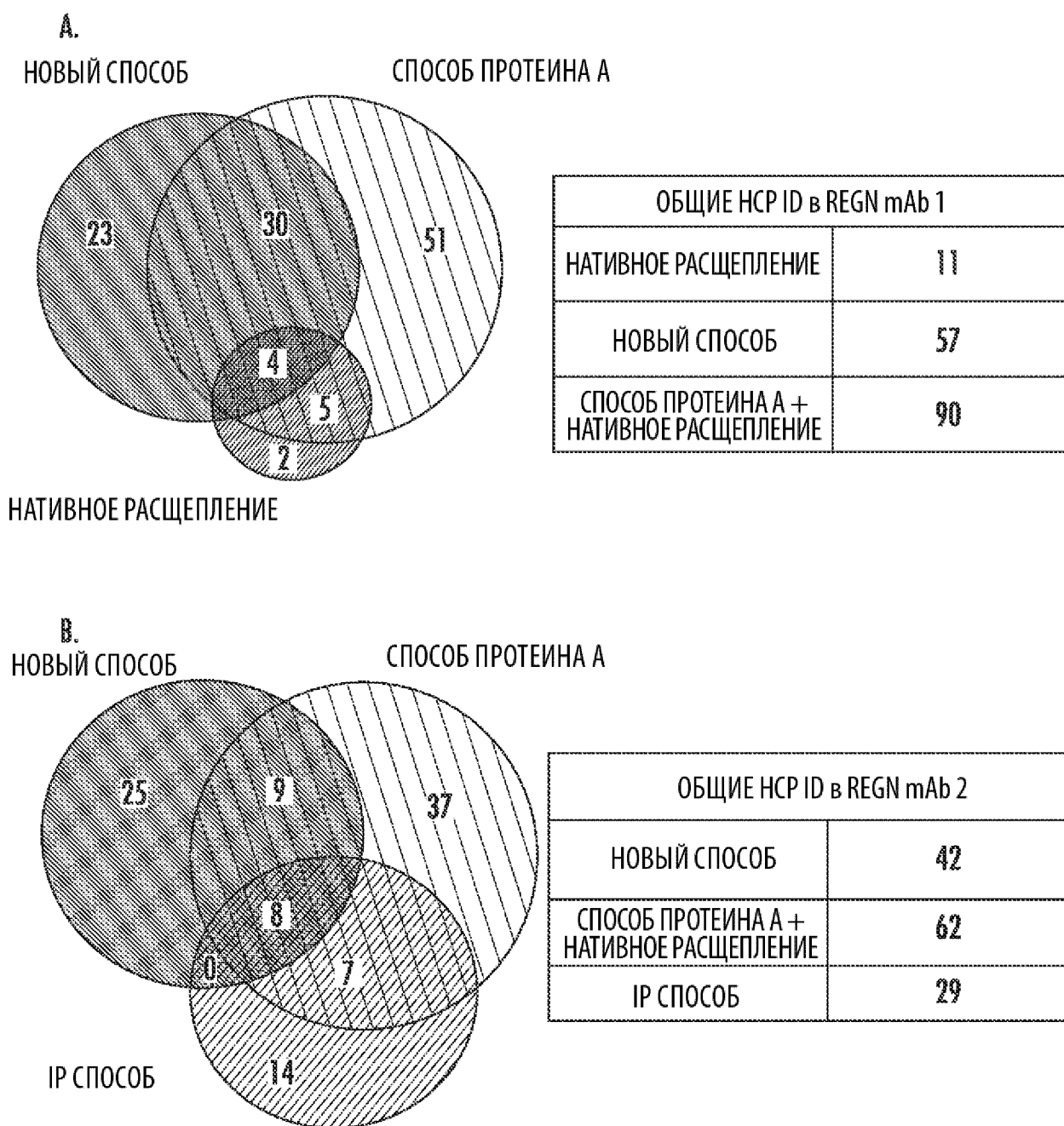
Фиг. 3С



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6