

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202390847 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.06

(51) Int. Cl. C12Q 1/37 (2006.01)  
G01N 33/60 (2006.01)  
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2021.09.11

(54) СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВОДОРОДНОГО ОБМЕНА

(31) 63/077,220

(72) Изобретатель:  
Чжан Сиси, Сяо Хой (US)

(32) 2020.09.11

(33) US

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

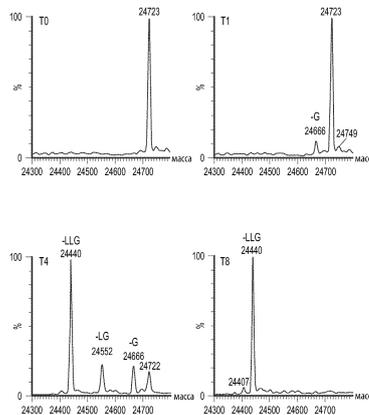
(86) PCT/US2021/049975

(87) WO 2022/056336 2022.03.17

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) Предложены способы идентификации сайта связывания между белковым фармацевтическим продуктом и белком клетки-хозяина (БКХ) с использованием масс-спектрометрии водородного обмена. Данная заявка также предлагает способы модификации белковых фармацевтических продуктов для устранения расщепления или модификации под действием БКХ. Кроме того, данная заявка предлагает способы блокирования идентифицированного сайта связывания в белковых фармацевтических продуктах для устранения расщепления или модификации под действием БКХ.



202390847  
A1

202390847  
A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577646EA/019

### СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ВОДОРОДНОГО ОБМЕНА ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Настоящая заявка заявляет приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/077220, поданной 11 сентября 2020 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится в общем к способам идентификации сайтов связывания белков клетки-хозяина в белках, представляющих интерес, или белковых фармацевтических продуктах с использованием масс-спектрометрии водородного обмена.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Присутствие остаточных белков клетки-хозяина (БКХ) может создавать потенциальную угрозу безопасности для биофармацевтических продуктов и проблемы на производстве, особенно в присутствии БКХ, обладающих ферментативными активностями. Поскольку технология рекомбинантной ДНК широко использовалась для производства биофармацевтических продуктов в клетках-хозяевах, для получения биофармацевтических продуктов высокой чистоты необходимо удалять примеси. Любые остаточные примеси после проведения биопроцессов очистки должны присутствовать на приемлемо низком уровне перед проведением клинических исследований. В частности, остаточные БКХ, полученные из систем экспрессии млекопитающих, например, клеток яичника китайского хомячка (СНО), могут поставить под угрозу безопасность, качество и стабильность продукта. Иногда даже следовые количества определенных БКХ могут вызывать иммуногенный ответ или нежелательное изменение. Таким образом, необходимо контролировать белки клетки-хозяина в лекарственных продуктах и в процессе производства.

Карбоксипептидаза (G3N8V5), несмотря на то, что она часто обнаруживается в лекарственных субстанциях, никогда не описывалась как вещество, влияющее на целостность моноклональных антител. В данном документе, карбоксипептидаза идентифицируется в лекарственной субстанции Fd', и описывается ее влияние на стабильность препарата Fd'. Также количественно определяется количество карбоксипептидазы в препарате Fd', и результаты позволяют предположить, что присутствие карбоксипептидазы в количестве всего 10 ppm может ухудшать стабильность препарата Fd'. Продолжение данного исследования позволило предположить, что карбоксипептидаза (G3N8V5) может также влиять на стабильность белка Fab, но не рекомбинантных моноклональных антител, созданных на основе IgG1 или IgG4.

Между тем, взаимодействия между БКХ и моноклональными антителами полностью не изучены. Наиболее распространенная концепция заключается в том, что БКХ коэлютируют с моноклональными антителами из-за неспецифического связывания

БКХ с моноклональными антителами. В данном документе, масс-спектрометрия с дейтеро-водородным обменом (HDX-MS) использована для изучения взаимодействий между препаратом Fd' и карбоксипептидазой, и идентифицирован специфический сайт связывания, позволяющий карбоксипептидазе расщеплять препарат Fd'. Аналогичный сайт связывания также обнаружен в белке Fab, расщепленном с помощью протеазы Fabricator. Однако в препарате слитого Fd' и препарате моноклональных антител не было выявлено специфического участка связывания.

Следует понимать, что существует потребность в способах идентификации и определения характеристик примесей БКХ, обладающих ферментативной активностью. В частности, такие способы должны быть способны исследовать механизмы связывания и/или ферментативные механизмы БКХ, например, выявление сайтов связывания БКХ в белковых фармацевтических продуктах. Эти способы должны обеспечить надежное, достоверное и чувствительное обнаружение и характеризацию ферментативных примесей БКХ в биофармацевтических продуктах и в образцах, отобранных во время производственных процессов. Кроме того, эти способы должны быть способны устранять или блокировать ферментативную активность БКХ путем модификации белкового фармацевтического продукта.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определение приемлемых уровней примесей БКХ стало критически важным вопросом при использовании систем биологической переработки для производства биофармацевтической продукции. Существует необходимость идентификации и определения характеристик остаточных примесей БКХ для изучения механизмов связывания и/или ферментативных механизмов БКХ. Данная заявка предусматривает способы идентификации сайтов связывания БКХ в белковых фармацевтических продуктах с использованием масс-спектрометрии водородного обмена (HX-MS), например, масс-спектрометрии с дейтеро/водородным обменом (HDX-MS). Данная заявка также предусматривает способы модификации белковых фармацевтических продуктов для устранения расщепления или модификации ферментативными БКХ. Кроме того, данная заявка предусматривает способы блокирования идентифицированного сайта связывания для устранения расщепления или модификации под действием БКХ.

Настоящее изобретение предусматривает способ идентификации сайта связывания между белком, представляющим интерес, и вторым белком. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ включает инкубацию образца, содержащего белок, представляющий интерес, и второй белок, с оксидом дейтерия, добавление к образцу гидролизующего агента для получения смеси с по меньшей мере одним продуктом гидролиза, определение молекулярной массы по меньшей мере одного продукта гидролиза в смеси с помощью масс-спектрометра, и сопоставление данных молекулярной массы по меньшей мере одного продукта гидролиза с данными, полученными для по меньшей мере одного известного белкового стандарта. В одном аспекте, второй белок представляет собой белок клетки-хозяина. В одном аспекте, образец инкубируют с

оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов при комнатной температуре. В другом аспекте, способ дополнительно включает гашение образца путем доведения рН до около 2,3 и/или доведения температуры до около 0 °С. В другом аспекте, смесь вводят в систему жидкостной хроматографии с подключенным в режиме онлайн масс-спектрометром. В еще одном аспекте, масс-спектрометр сопряжен с системой жидкостной хроматографии.

В одном аспекте, второй белок способен расщеплять белок, представляющий интерес. В другом аспекте, расщепление затрагивает кислотный остаток, например, остаток аспартата или остаток глутамата. В другом аспекте, расщепление происходит на С-конце белка, представляющего интерес. В другом аспекте, второй белок представляет собой карбоксипептидазу. В одном аспекте, второй белок представляет собой карбоксипептидазу серинового типа. В еще одном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой VEGF-связывающий белок или мини-ловушку VEGF. В дополнительном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой Fab или F(ab')<sub>2</sub>. В одном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой белковый фармацевтический продукт, антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

Настоящее изобретение, по меньшей мере частично, предусматривает способ модификации белка, представляющего интерес, для устранения расщепления белка, представляющего интерес, вторым белком. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, способ включает (а) идентификацию остатка, задействованного в механизме расщепления белка, представляющего интерес, вторым белком, путем: инкубации образца, содержащего белок, представляющий интерес, и второй белок, с оксидом дейтерия, добавления гидролизующего агента к образцу для получения смеси с по меньшей мере одним продуктом гидролиза, определения данных молекулярного веса по меньшей мере одного продукта гидролиза в смеси с использованием масс-спектрометра, и сопоставления данных молекулярного веса по меньшей мере одного продукта гидролиза с данными, полученными для по меньшей мере одного известного белкового стандарта; и (b) мутирование идентифицированного остатка во второй остаток для устранения расщепления белка, представляющего интерес, вторым белком.

В одном аспекте, второй белок представляет собой белок клетки-хозяина. В одном аспекте, образец инкубируют с оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов. В другом аспекте, смесь вводят в систему жидкостной хроматографии. В другом аспекте, к системе жидкостной хроматографии подключен в режиме онлайн масс-спектрометр. В еще одном аспекте, масс-спектрометр сопряжен с системой жидкостной хроматографии. В некоторых аспектах, второй белок способен расщеплять белок, представляющий интерес. В другом аспекте, расщепление затрагивает кислотный остаток, например, остаток аспартата или остаток глутамата. В другом аспекте, расщепление происходит на С-конце белка, представляющего интерес. В другом аспекте, остаток

аспартата мутируют в основную аминокислоту или нейтральную аминокислоту. В еще одном аспекте, остаток глутамата мутируют в основную аминокислоту или нейтральную аминокислоту. В дополнительном аспекте, второй белок представляет собой карбоксипептидазу. В одном аспекте, второй белок представляет собой карбоксипептидазу серинового типа. В другом аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой VEGF-связывающий белок или мини-ловушку VEGF. В одном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой Fab или F(ab')<sub>2</sub>. В другом аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой белковый фармацевтический продукт, антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

Настоящее изобретение, по меньшей мере частично, предусматривает способ модификации белка, представляющего интерес, для устранения расщепления белка, представляющего интерес, вторым белком. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, способ включает (а) идентификацию сайта связывания между белком, представляющим интерес, и вторым белком путем инкубации образца, содержащего белок, представляющий интерес, и второй белок, с оксидом дейтерия, добавления гидролизующего агента к образцу для получения смеси, содержащей по меньшей мере один продукт гидролиза, определения данных молекулярного веса по меньшей мере одного продукта гидролиза с использованием масс-спектрометра, и сопоставления данных молекулярного веса по меньшей мере одного продукта гидролиза с данными, полученными для по меньшей мере одного известного белкового стандарта; и (б) блокирование идентифицированного сайта связывания для устранения расщепления белка, представляющего интерес, вторым белком. В одном аспекте, второй белок представляет собой белок клетки-хозяина. В одном аспекте, образец инкубируют с оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов. В одном аспекте, смесь вводят в систему жидкостной хроматографии. В одном аспекте, к системе жидкостной хроматографии подключен в режиме онлайн масс-спектрометр. В одном аспекте, масс-спектрометр сопряжен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте, второй белок способен расщеплять белок, представляющий интерес. В одном аспекте, расщепление затрагивает кислотный остаток, такой как остаток аспартата или остаток глутамата. В другом аспекте, расщепление происходит на С-конце белка, представляющего интерес. В одном аспекте, второй белок представляет собой карбоксипептидазу. В одном аспекте, второй белок представляет собой карбоксипептидазу серинового типа. В одном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой VEGF-связывающий белок или мини-ловушку VEGF. В одном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой Fab или F(ab')<sub>2</sub>. В одном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой белковый фармацевтический продукт, антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или

лекарственное средство. В одном аспекте, способ дополнительно включает блокирование идентифицированного сайта связывания с использованием генной мутации, нокаута, химической модификации, ферментативной модификации, или их комбинаций.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения можно будет лучше оценить и понять при рассмотрении в сочетании с приведенным далее описанием и прилагаемыми графическими материалами. Нижеследующее описание, несмотря на указания различных вариантов осуществления изобретения и их многочисленных конкретных деталей, приводится в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перегруппировки могут быть выполнены без выхода за пределы объема изобретения.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

На Фиг. 1 показан анализ делеции С-конца из мини-ловушки VEGF примесями БКХ в различные промежуточные моменты времени, включая нулевой день (T0), первый день (T1), четвертый день (T4) или восьмой день (T8), с использованием масс-спектрометрии интактных молекул в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На Фиг. 2 показано использование иммунопреципитации в качестве метода профилирования для идентификации БКХ в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. Покрытые стрептавидином магнитные шарики и биотинилированные антитела против БКХ F550 были использованы для обогащения БКХ в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На Фиг. 3 показан анализ делеции С-конца из фрагмента F(ab')<sub>2</sub> MAB1 под действием примесей БКХ в различные промежуточные моменты времени с использованием масс-спектрометрии интактных молекул в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. Примеси БКХ присутствовали в образце мини-ловушки VEGF в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На Фиг. 4 показан анализ делеции С-конца из фрагмента F(ab')<sub>2</sub> MAB1 рекомбинантной карбоксипептидазой в различные промежуточные моменты времени с использованием масс-спектрометрии интактных молекул в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На Фиг. 5 показывана трехмерная структура белкового комплекса, содержащего мини-ловушку VEGF и карбоксипептидазу, на основе результатов анализа методом НХ-MS в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления. В мини-ловушке VEGF была идентифицирована область сильной защиты, которая указывала на сайт связывания карбоксипептидазы в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

При производстве биофармацевтических продуктов, для получения биофармацевтических продуктов высокой чистоты необходимо удалять примеси. Стабильность лекарственных форм должна поддерживаться на протяжении производства, хранения, транспортировки, обращения и применения. Остаточные белки клетки-хозяина

(БКХ) в биофармацевтических продуктах могут создавать потенциальные угрозы безопасности для пациентов вследствие ухудшения стабильности и качества продукта. В частности, некоторые примеси БКХ, обладающие ферментативной активностью, такие как протеазы, могут вызывать нежелательную деградацию, модификации или изменения биофармацевтических продуктов. Идентификация и устранение специфических ферментативных БКХ критически важны для обеспечения безопасности и стабильности продукта. Критически важно понимать механизмы реакций ферментативных БКХ, включая рабочие условия ферментативных реакций, расположение сайтов связывания фермента в субстратах, расположение сайтов расщепления/модификации в субстратах, а также результаты ферментативных реакций, такие как химические структуры конечных продуктов.

Данная заявка предусматривает способы идентификации сайтов связывания БКХ в белковых фармацевтических продуктах с использованием НХ-MS. Данная заявка также предусматривает способы модификации белковых фармацевтических продуктов для устранения расщепления или модификации белковых фармацевтических продуктов ферментативными БКХ. Способ по настоящему изобретению может дополнительно включать стадию мутирования идентифицированного остатка в белковых фармацевтических продуктах для устранения расщепления или модификации ферментативными БКХ, причем идентифицированный остаток задействован в идентифицированных механизмах связывания и/или ферментативных механизмах. Кроме того, данная заявка может дополнительно включать стадию блокирования идентифицированного сайта связывания для устранения расщепления или модификации биофармацевтических продуктов ферментативными БКХ.

В некоторых вариантах осуществления, данная заявка предусматривает способ идентификации сайтов связывания БКХ в белковом фармацевтическом продукте с использованием НХ-MS. Способ по настоящему изобретению включает стадии инкубирования образца, содержащего белковый фармацевтический продукт и БКХ, с оксидом дейтерия, добавления гидролизующего агента к образцу для получения пептидной смеси, определения данных молекулярного веса пептидной смеси с использованием масс-спектрометра, и анализа/сопоставления данных молекулярного веса пептидной смеси с данными известных белковых стандартов. В одном аспекте, пептидную смесь анализируют с помощью масс-спектрометра, сопряженного в режиме онлайн с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте, данная заявка предусматривает способ модификации белкового фармацевтического продукта для устранения расщепления белкового фармацевтического продукта ферментативными БКХ. Способ модификации белкового фармацевтического продукта включает стадии идентификации аминокислотного остатка, который задействован в механизме расщепления БКХ, и мутирования идентифицированного остатка в другой остаток для устранения расщепления белкового фармацевтического продукта под действием БКХ. В одном аспекте, способ модификации белкового фармацевтического продукта включает стадии идентификации

аминокислотного остатка, который задействован в сайте связывания БКХ, и блокирования идентифицированного сайта связывания для устранения расщепления белкового фармацевтического продукта под действием БКХ. Способ блокирования идентифицированного сайта связывания включает генную мутацию, нокаут, химическую модификацию, ферментативную модификацию, или их комбинации.

В одном аспекте, БКХ представляет собой карбоксипептидазу серинового типа, которая способна расщеплять белковый фармацевтический продукт на С-конце. В другом аспекте, механизм расщепления карбоксипептидазы серинового типа включает кислотный остаток, такой как остаток аспартата или остаток глутамата. В еще одном аспекте, белковый фармацевтический продукт представляет собой VEGF-связывающий белок, мини-ловушку VEGF, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

Требования повышения качества, эффективности и безопасности биофармацевтических продуктов привели к растущей потребности в идентификации и определении характеристик примесей БКХ, обладающих ферментативными активностями. Описание настоящего изобретения обеспечивает способы удовлетворения вышеупомянутых требований. Иллюстративные варианты осуществления, раскрытые в данном документе, удовлетворяют вышеупомянутым требованиям путем обеспечения способов идентификации сайта связывания между белковым фармацевтическим продуктом и БКХ, с целью модификации белкового фармацевтического продукта для устранения расщепления под действием БКХ, и с целью блокирования идентифицированного сайта связывания для устранения расщепления под действием БКХ.

Следует понимать, что термины в единственном числе означают «по меньшей мере один», а термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные отклонения, как будет понятно специалистам в данной области техники; а случае указания диапазонов значений, они включают конечные точки. Используемые в данном документе термины «включать», «включает» и «включающий» следует понимать как неограничивающие и означающие, соответственно, «содержать», «содержит» и «содержащий».

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, данная заявка предусматривает способ идентификации сайта связывания между белком, представляющим интерес, и вторым белком с использованием масс-спектрометрии водородного обмена, включающий инкубацию образца, содержащего белок, представляющий интерес, и второй белок, с оксидом дейтерия, добавление гидролизующего агента к образцу для получения смеси с по меньшей мере одним продуктом гидролиза, определение данных молекулярного веса по меньшей мере одного продукта гидролиза в смеси с использованием масс-спектрометра, и сопоставление данных молекулярного веса по меньшей мере одного продукта гидролиза с данными, полученными для по меньшей мере одного известного белкового стандарта. В одном

аспекте, второй белок представляет собой белок клетки-хозяина. В другом аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой VEGF-связывающий белок, мини-ловушку VEGF, или Fab или F(ab')<sub>2</sub>. В дополнительном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой белковый фармацевтический продукт, антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

Используемый в данном документе термин «масс-спектрометрия водородного обмена», «HX-MS», «масс-спектрометрия с дейтеро/водородным обменом» или «HDX-MS» относится к измерениям включения дейтерия в белковые молекулы с использованием масс-спектрометрии (МС). HX-MS может быть использована для контроля структурных и динамических аспектов белковых молекул в растворе, поскольку воздействие на молекулу белка оксида дейтерия (оксида дидейтерия, D<sub>2</sub>O, или тяжелой воды) может индуцировать быстрый обмен H (водорода) амида на D (дейтерий) амида в неупорядоченных областях, где отсутствуют стабильные водородные связи, например, протекание реакции водородного обмена, реакции дейтеро/водородного обмена или HDX-реакции. После этого, картирование пептидов на основе масс-спектрометрии (МС) может быть использовано для измерения массовых сдвигов отдельных сегментов белка. (Konermann et al., Hydrogen exchange mass spectrometry for studying protein structure and dynamics, Chem Soc Rev. March 2011, 40(3), page 1224-1234). После гашения реакции водородного обмена белки подвергают протеолизу для получения пептидной смеси. Затем, местоположение и относительное количество дейтериевых обменов в этих пептидах может быть определено и проанализировано на основе массовых сдвигов отдельных пептидов с помощью МС. Дейтерий содержит нейтрон и протон. Поскольку ядро дейтерия в два раза тяжелее ядра водорода, молекула белка становится тяжелее, когда водород в ней заменяется дейтерием. Измерение скорости обмена водорода амида основной цепи (скорость обмена H/D) белковых молекул может дать подробную информацию о структуре, динамике и взаимодействии белков. Включение дейтерия амида в интактные белковые молекулы может быть измерено путем анализа полученной пептидной смеси с помощью жидкостной хроматографии, сопряженной с источником ионизации электрораспылением МС. В нативных структурах белковых молекул скорости водородного обмена могут различаться на несколько порядков величины. Скорость водородного обмена является функцией доступности растворителя и образования водородных связей. Амидные водороды на поверхности белковых молекул связаны с водой, которая проявляет высокую скорость водородного обмена. Амидные водороды, расположенные в стабильных вторичных структурах белковых молекул, демонстрируют низкие скорости водородного обмена (Johnson et al., Mass Spectrometric Measurement of Protein Amide Hydrogen Exchange of Apo- and Holo-Myoglobin". Protein Science, 1994, 3 (12): 2411-2418).

Используемый в данном документе термин «белок» включает любой полимер из аминокислот, имеющий ковалентные амидные связи. Белки содержат одну или несколько

полимерных цепей аминокислот, общеизвестных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептиды» относятся к полимерам, состоящим из аминокислотных остатков, родственных им природных структурных вариантов и синтетических неприродных аналогов, соединенных пептидными связями, родственных природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов. «Синтетические пептиды или полипептиды» относятся к не встречающимся в природе пептидам или полипептидам. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные методы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или множество полипептидов, образующих единую функционирующую биомолекулу. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, используемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других связывающих молекул химерного рецептора Fc, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител и биспецифических антител. В еще одном иллюстративном аспекте, белок может включать фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием рекомбинантных клеточных систем продуцирования, таких как бакуловирусная система на основе клеток насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*), системы на основе клеток млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Обзор, посвященный биотерапевтическим белкам и их получению, приведен в Ghaderi et al., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 147-176 (2012). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, белки включают 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, метку FLAG, мальтоза-связывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), эпитоп тус, флуоресцентные метки и 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 фибриллярные белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

Используемый в данном документе термин «гидролизующий агент» относится к любому одному или комбинации большого числа различных агентов, которые могут осуществлять расщепление молекулы белка. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают трипсин, эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C,

протеазу внешней мембраны T (OmpT), разрушающий иммуноглобулин фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназу и протеазу *Aspergillus saitoi*. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают применение высокой температуры, микроволнового излучения, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения и растворителей (неограничивающими примерами являются этанол и ацетонитрил). Пример неферментативного расщепления может также включать расщепление иммобилизованным ферментом (IMER), ферменты, иммобилизованные на магнитных частицах, и ферменты, иммобилизованные на чипах. Обзор, описывающий доступные методики расщепления белков, приведен Linda Switzar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, *Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments*, 12 *Journal of Proteome Research* 1067-1077 (2013). Какой-либо один или комбинация гидролизующих агентов может расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде специфическим для последовательности образом, генерируя прогнозируемую коллекцию более коротких пептидов. Имеется несколько подходов, которые можно использовать для гидролиза белковой молекулы. Один из широко распространенных способов расщепления белковых молекул в образце предусматривает применение протеаз. Доступно множество протеаз, каждая из них имеет свои особенности с точки зрения специфичности, эффективности и оптимальных условий расщепления. Протеазы относятся как к эндопептидазам, так и к экзопептидазам, которые классифицируются на основе способности протеазы расщеплять неконцевые или концевые аминокислоты в пептиде. Альтернативно, протеазы также относятся к шести различным классам: аспарагиновые, глутаминовые и металлопротеазы, цистеиновые, сериновые и треониновые протеазы, которые разделяют на основе механизма катализа. Термины «протеаза» и «пептидаза» применяются взаимозаменяемо для обозначения ферментов, которые гидролизуют пептидные связи. Протеазы также можно разделить на специфические и неспецифические протеазы. Используемый в данном документе термин «специфическая протеаза» относится к протеазе, обладающей способностью расщеплять пептидный субстрат по специфической аминокислотной боковой цепи пептида. Используемый в данном документе термин «неспецифическая протеаза» относится к протеазе с пониженной способностью расщеплять пептидный субстрат по специфической аминокислотной боковой цепи пептида. Предпочтительное расщепление может быть определено на основе отношения количества конкретной аминокислоты, являющейся сайтом расщепления, к общему количеству расщепленных аминокислот в белковых последовательностях.

Используемый в данном документе термин «продукт гидролиза» относится к производному продукту, такому как пептид, полученному в результате гидролиза одной или нескольких пептидных связей белка с использованием гидролизующего агента. Существует несколько подходов к проведению гидролиза или расщепления белка в образце с помощью пригодного гидролизующего агента, например, ферментативное

расщепление или неферментативное расщепление.

Используемый в данном документе термин «белок клетки-хозяина» включает белок, полученный из клетки-хозяина, и может не иметь отношения к желаемому белку, представляющему интерес. Белок клетки-хозяина может представлять собой технологическую примесь, которая может образовываться в процессе производства, и может включать три основные категории: примеси, происходящие из клеточного субстрата; примеси, происходящие из клеточной культуры, и примеси, образующиеся на последующих стадиях процесса. Примеси, происходящие из клеточного субстрата, включают, без ограничений, белки, полученные из организма хозяина, и нуклеиновые кислоты (геномную, векторную или общую ДНК клетки-хозяина). Примеси, происходящие из клеточной культуры, включают, без ограничений, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, образующиеся на последующих стадиях процесса, включают, без ограничения, ферменты, реагенты для химической и биохимической обработки (например, цианогенбромид, гуанидин, окисляющие и восстанавливающие реагенты), неорганические соли (например, тяжелых металлов, мышьяка, неметаллического иона), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие вымываемые вещества.

Используемые в данном документе «мини-ловушка» или «связывающая молекула мини-ловушки» относятся к молекуле, способной связываться с той же мишенью, что и связывающая молекула слитого белка, которая может быть использована для получения мини-ловушки. Такие мини-ловушки могут включать (i) химерные полипептиды, а также (ii) мультимерные (например, димерные) молекулы, содержащие два или больше полипептидов, которые связаны нековалентно или ковалентно, например, одним или несколькими дисульфидными мостиками.

Используемые в данном документе «мини-ловушка VEGF» или «связывающая молекула мини-ловушки VEGF» могут быть способны связываться с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и терапевтически пригодны для лечения или предотвращения состояний и заболеваний, которые можно лечить или предотвращать ингибированием VEGF (например, VEGF<sub>110</sub>, VEGF<sub>121</sub> или VEGF<sub>165</sub>), таких как ангиогенные расстройства глаз и раковые заболевания. Такие мини-ловушки включают (i) химерные полипептиды, содержащие один или несколько доменов рецептора VEGF, а также (ii) мультимерные (например, димерные) молекулы, содержащие два или больше полипептидов, которые связаны нековалентно, например, одним или несколькими дисульфидными мостиками. Ингибирование VEGF включает, например, антагонизм связывания VEGF с рецептором VEGF. Компоненты домена рецептора VEGF мини-ловушек VEGF в соответствии с данной заявкой включают иммуноглобулин-подобный (Ig) домен 2 VEGFR1 (Flt1) (R1D2), Ig-домен 3 VEGFR2 (Flk1 или KDR) (Flk1D3) (R2D3), и/или Ig-домен 3 VEGFR3 (Flt4) (Flt1D3 или R3D3). Ig-домены, упоминаемые в данном документе, например, R1D2, R2D3, R2D4 и R3D3, должны охватывать не только полный Ig-домен дикого типа, но и его варианты, которые по существу сохраняют функциональные характеристики домена

дикого типа, например, сохраняют способность образовывать функционирующий VEGF-связывающий домен при включении в мини-ловушку VEGF. Специалисту в данной области техники будет понятно, что могут быть получены многочисленные варианты вышеупомянутых Ig-доменов, которые будут сохранять по существу такие же функциональные характеристики, что и домен дикого типа. В некоторых аспектах, связывающая молекула мини-ловушки может включать вариант связывающей молекулы мини-ловушки. «Вариант» или «вариант связывающей молекулы», при использовании в данном документе, может включать связывающую молекулу, которая отличается от целевой связывающей молекулы по меньшей мере одной аминокислотной модификацией или посттрансляционной модификацией. Вариант может относиться к самой связывающей молекуле, композиции, содержащей связывающую молекулу, или аминокислотной последовательности, которая ее кодирует. Предпочтительно, вариант связывающей молекулы имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходной связывающей молекулой, например, от около одной до около десяти аминокислотных модификаций, и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных модификаций по сравнению с исходной связывающей молекулой. Последовательность варианта связывающей молекулы в данном документе предпочтительно будет иметь по меньшей мере около 80% гомологии с последовательностью исходной связывающей молекулы, более предпочтительно, по меньшей мере около 90% гомологии, и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 95% гомологии. В некоторых аспектах, связывающая молекула мини-ловушки может быть получена расщеплением связывающей молекулы слитого белка.

Используемый в данном документе термин «Fab» или «F(ab')<sub>2</sub>» относится к некоторым специфическим фрагментам антитела, таким как фрагменты антитела, которые образуются при использовании протеазы. Протеазы, пригодные для получения фрагментов антитела, таких как фрагмент Fab или F(ab')<sub>2</sub>, или связывающей молекулы VEGF на основе мини-ловушки, включают эндопротеиназы, такие как тромбин, папаин, фицин, цистеиновая протеаза SpeB (FabULOUS) или цистеиновая протеаза IdeS (FabRICATOR®). Предпочтительно, эндопротеиназа представляет собой цистеиновую протеазу IdeS (FabRICATOR®). Например, IdeS специфически расщепляет IgG человека в шарнирной области между двумя остатками глицина константной последовательности ELLGGPS, и SpeB расщепляет в шарнирной области между треонином и цистеином в последовательности KTHTCPPC. FabRICATOR® (Genovis #A0-FR1-020) является коммерчески доступным.

Применяемый в данном документе термин «белковый фармацевтический продукт» включает активный ингредиент, который может быть полностью или частично биологическим по природе. В одном аспекте, белковый фармацевтический продукт может содержать пептид, белок, слитый белок, антитело, моноклональное антитело, биспецифическое антитело, антиген, вакцину, конъюгат пептид-лекарственное средство, конъюгат антитело-лекарственное средство, конъюгат белок-лекарственное средство,

клетки, ткани, или их комбинации. В другом аспекте, белковый фармацевтический продукт может содержать рекомбинантную, сконструированную, модифицированную, мутированную или усеченную версию пептида, белка, слитого белка, антитела, антигена, вакцины, конъюгата пептид-лекарственное средство, конъюгата антитело-лекарственное средство, конъюгата белок-лекарственное средство, клеток, тканей, или их комбинаций.

При использовании в данном описании, «антитело» должно относиться к иммуноглобулиновым молекулам, состоящим из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), со вставками более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая из VH и VL может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных, от amino-конца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает, без ограничения, антитела, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с использованием рекомбинантных средств, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. IgG включает подмножество антител.

Используемый в данном документе термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. Термины «антигенсвязывающий участок» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, включающие проведение манипуляций и экспрессии ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или является легкодоступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и проводить с ней манипуляции химическим путем или с использованием методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или нескольких переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или

делеции аминокислот и т.д.

При использовании в данном документе, фраза «биспецифическое антитело» включает антитело, способное избирательно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, причем тяжелые цепи специфически связываются с разными эпитопами, будь то на двух разных молекулах (например, антигенах), или на одной и той же молекуле (например, на одном и том же антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), то аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один-два, или три, или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или на разных мишенях (например, на одном и том же или на разных белках). Биспецифические антитела можно получить, например, путем объединения тяжелых цепей, распознающих разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

Типичное 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 любой тяжелой цепью, либо может ассоциироваться с любой из тяжелых цепей и может связывать один или несколько эпитопов, связанных антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или может ассоциироваться с любой из тяжелых цепей и обеспечивать связывание одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. Биспецифические антитела (bsAb) можно разделить на два основных класса: те, которые несут Fc-область (IgG-подобные), и те, у которых отсутствует Fc-область, при этом последние обычно имеют меньший размер, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные bsAb могут иметь разные форматы, такие как, без ограничений, триомаб (triomab), IgG «выступы-во-впадины» (kih IgG), кроссмаб (crossMab), IgG с ортогональным Fab (orth-Fab IgG), Ig с двойными переменными доменами (DVD-Ig), Fab два-в-одном или Fab двойного действия (DAF), IgG-одноцепочечный Fv (IgG-scFv) или κλ-тельца. Различные форматы, отличные от IgG-подобных молекул, включают тандемные scFv, формат диател, одноцепочечное диатело, тандемные диатела (TandAbs), перенацеливающиеся молекулы с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, нанотела или антитела, получаемые с помощью метода «состыковки и замыкания» (dock-and-lock, DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 Journal of Hematology & Oncology 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific

Antibodies, Handbook of Therapeutic Antibodies 265-310 (2014)).

Используемый в данном документе термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, без ограничений, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент scFv, фрагмент Fv, димер dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триател, тетраател, 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 с помощью пептидного линкера. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, чтобы связываться с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых иллюстративных вариантах осуществления фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сравнимой с аффинностью исходного антитела, и/или конкурирует с исходным антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела может быть получен любыми средствами. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем посредством фрагментации интактного антитела, и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Альтернативно или дополнительно, фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно или дополнительно, фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот, и более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

В одном аспекте, образец в соответствии с данной заявкой инкубируют с оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов при комнатной температуре. В одном аспекте, способ дополнительно включает гашение образца путем доведения pH до около 2,3 и/или доведения температуры до около 0 °C. В одном аспекте, смесь вводят в систему жидкостной хроматографии с подключенным в режиме онлайн масс-спектрометром. В одном аспекте, масс-спектрометр сопряжен с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте, масс-спектрометр в способе по настоящему изобретению может быть масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением или тройным квадрупольным масс-спектрометром, при этом масс-спектрометр сопряжен с системой жидкостной хроматографии.

Используемый в данном документе термин «масс-спектрометр» включает устройство, способное идентифицировать конкретные молекулярные фрагменты и измерять их точные массы. Подразумевается, что указанный термин включает любой молекулярный детектор, в который полипептид или пептид могут быть элюированы для детекции и/или характеристики. Масс-спектрометр может включать три основных части: источник ионов, массовый анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры аналита можно одновременно переносить в газовую фазу и ионизировать (как при ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов в значительной степени зависит от применения.

В настоящем описании термин «ионизация электрораспылением» или «ESI» относится к способу распылительной ионизации, при котором катионы или анионы в растворе переносятся в газовую фазу путем образования и десольватации при атмосферном давлении пара из сильно заряженных капелек, получаемого при приложении разности потенциалов между наконечником распыляющего капилляра, содержащего раствор, и противоэлектродом. В общем, существует три основных стадии получения ионов в газовой фазе из ионов электролитов в растворе. Это: (а) получение заряженных капель на нагнетающем наконечнике электрораспылителя; (б) усыхание заряженных капель благодаря испарению растворителя и повторное разрушение капель, приводящее к образованию маленьких сильно заряженных капелек, способных создавать ионы в газовой фазе; и (с) механизм, по которому образуются ионы в газовой фазе из очень маленьких и сильно заряженных капелек. Стадии (а)-(с) обычно протекают в области устройства с атмосферным давлением. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может быть масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением.

Используемый в данном документе термин «тройной квадрупольный масс-спектрометр» относится к тандемному масс-спектрометру, состоящему из двух квадрупольных последовательно расположенных масс-анализаторов, с (не разрешающим по массе) только радиочастотным (РЧ) квадруполем между ними, служащим ячейкой для индуцируемой столкновениями диссоциации. В тройном квадрупольном масс-спектрометре, образец пептида вводят в систему жидкостной хроматографии, сопряженную с инструментом МС. Первый квадруполь может быть использован в качестве масс-фильтра для выделения пептидов с целевыми значениями  $m/z$ . Второй квадруполь служит столкновительной ячейкой для разрушения пептида на фрагменты. Третий квадруполь служит вторым масс-фильтром для фрагментов исходного пептида с заданными значениями  $m/z$ . Используемый в данном документе термин «тандемная масс-спектрометрия» включает методику, в которой структурная информация о молекулах образца может быть получена путем использования множества стадий селекции по массе и разделения по массе. Необходимым условием является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в интактном состоянии, и что можно

индуцировать их распад некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первой стадии селекции по массе. Многоступенчатая МС/МС, или MS<sup>n</sup>, может быть выполнена путем сначала селекции и выделения иона-предшественника (MS<sup>2</sup>), его фрагментации, выделения первичного иона-фрагмента (MS<sup>3</sup>), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (MS<sup>4</sup>) и т.д. до тех пор, пока может быть получена значимая информация или может детектироваться сигнал иона-фрагмента. Тандемную МС успешно выполняли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализаторов для комбинаций в конкретных применениях может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Двумя основными категориями способов тандемной МС являются «тандем в пространстве» и «тандем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «тандем во времени» сопряжены в пространстве или с анализаторами «тандем в пространстве». Масс-спектрометр «тандем в пространстве» включает источник ионов, устройство активации ионов-прекурсоров и по меньшей мере два не-захватных масс-анализатора. Конкретные функции разделения  $m/z$  могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной секции прибора происходила селекция ионов, затем диссоциация в промежуточной области и передача ионов продукта в другой анализатор для разделения по  $m/z$  и сбора данных. В масс-спектрометрах «тандем во времени» ионы, образующиеся в ионном источнике, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по  $m/z$  в одном и том же физическом устройстве.

Выявленные масс-спектрометром пептиды могут применяться в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно использовать для характеристики белков путем сопоставления экспериментальных и теоретических данных МС/МС, при этом последние генерируются по возможным пептидам в базе данных белковых последовательностей. Указанная характеристика включает, без ограничений, секвенирование аминокислот белковых фрагментов, проведение секвенирования белка, проведение секвенирования белка *de novo*, локализацию посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

Используемый в данном документе термин «система для жидкостной хроматографии» или «хроматографическая система» относится к процессу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью или газом, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального разделения химических соединений при их протекании вокруг или по стационарной жидкой или твердой фазе. Неорганические примеры хроматографии включают традиционную обращенно-фазовую (ОФ), ионообменную (ИОХ), хроматографию со смешанным режимом и нормально-фазовую хроматографию (НФ).

#### **Примеры вариантов осуществления**

Варианты осуществления, раскрытые в данном документе, обеспечивают способы идентификации сайта связывания между белковым фармацевтическим продуктом и БКХ с

использованием масс-спектрометрии водородного обмена для исследования механизмов связывания и/или ферментативных механизмов БКХ.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, данная заявка предусматривает способ идентификации сайта связывания между белком, представляющим интерес, и вторым белком с использованием масс-спектрометрии водородного обмена, включающий инкубацию образца, содержащего белок, представляющий интерес, и второй белок, с оксидом дейтерия, добавление гидролизующего агента к образцу для получения смеси с по меньшей мере одним продуктом гидролиза, определение данных молекулярного веса по меньшей мере одного продукта гидролиза в смеси с использованием масс-спектрометра, и сопоставление данных молекулярного веса по меньшей мере одного продукта гидролиза с данными, полученными для по меньшей мере одного известного белкового стандарта.

В одном аспекте, гидролизующий агент по настоящему изобретению, который может осуществлять ферментативное расщепление, включает трипсин, эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C, протеазу внешней мембраны T (OmpT), разрушающий иммуноглобулин фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназу и протеазу *Aspergillus saitoi*.

В одном аспекте, второй белок по настоящему изобретению представляет собой БКХ, ферментативный БКХ, карбоксипептидазу, карбоксипептидазу серинового типа или карбоксипептидазу G3H8V5.

В одном аспекте, представляющий интерес белок по настоящему изобретению представляет собой VEGF-связывающий белок, мини-ловушку VEGF, Fab-область антитела, F(ab')<sub>2</sub> область антитела, белковый фармацевтический продукт, антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, способ по настоящему изобретению включает стадию инкубирования образца с оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов при комнатной температуре и стадию гашения образца путем доведения pH до около 2,3 и/или доведения температуры до около 0 °C.

В одном аспекте, способ по настоящему изобретению включает стадию инкубирования образца, содержащего белок, представляющий интерес, и второй белок, с оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов, около 1 минуты, около 2 минут, около 3 минут, около 5 минут, около 8 минут, около 10 минут, около 15 минут, около 20 минут, около 30 минут, около 40 минут, около 50 минут, около 55 минут, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 5 часов, около 6 часов, около 8 часов, около 10 часов, около 12 часов, около 15 часов, около 18 часов, около 20 часов, около 22 часов, около 24 часов, около 36 часов или около 72 часов. В одном аспекте, способ по настоящему изобретению включает стадию инкубирования образца, содержащего белок, представляющий интерес, и второй белок, с оксидом дейтерия при комнатной температуре, при около 18 °C, при около 25 °C, при около 30°C или при около

37°C в течение от около 60 секунд до около 24 часов, около 1 минуты, около 2 минут, около 3 минут, около 5 минут, около 8 минут, около 10 минут, около 15 минут, около 20 минут, около 30 минут, около 40 минут, около 50 минут, около 55 минут, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 5 часов, около 6 часов, около 8 часов, около 10 часов, около 12 часов, около 15 часов, около 18 часов, около 20 часов, около 22 часов, около 24 часов, около 36 часов или около 72 часов.

В одном аспекте, способ по настоящему изобретению включает стадию гашения образца путем доведения рН реакционной смеси до около 2,3, около 2,0, около 2,1, около 2,2, около 2,4, около 2,5, около 2,6, около 2,7, около 2,8 или около 2,9. В одном аспекте, способ по настоящему изобретению включает стадию гашения образца путем доведения температуры реакционной смеси до около 0 °С, около 1 °С, около 2 °С, около 3 °С, около 4°С или около 5 °С.

Следует понимать, что способ не ограничен чем-либо из вышеперечисленных примесей БКХ, ферментативных сайтов связывания, масс-спектрометрий водородного обмена, VEGF-связывающих белков, мини-ловушек VEGF, фрагментов Fab, фрагментов F(ab')<sub>2</sub>, белковых фармацевтических продуктов, пептидов, белков, систем жидкостной хроматографии или масс-спектрометров.

Последовательное обозначение стадий способа цифрами и/или буквами, как предусмотрено в данном документе, не означает ограничения способа или его вариантов осуществления конкретным указанным порядком. Во всем описании настоящего изобретения упоминаются различные публикации, включая патенты, заявки на выдачу патента, опубликованные заявки на выдачу патента, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из таких упомянутых ссылок включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме и во всех отношениях. Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют значения, являющиеся общепринятыми для рядовых специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение. Данное описание будет более понятным со ссылкой на следующие примеры, которые приведены с целью более подробного описания настоящего изобретения. Они предназначены для иллюстрации и не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Идентификация и характеристика ферментативных БКХ**

Образцы, содержащие мини-ловушку VEGF и примеси БКХ, инкубировали при 37°C в течение около 2 недель или дольше. Образцы для тестирования отбирали в различные промежуточные моменты времени, такие как нулевой день (T<sub>0</sub>), первый день (T<sub>1</sub>), четвертый день (T<sub>4</sub>) или восьмой день (T<sub>8</sub>), и анализировали с использованием масс-спектрометрии интактных молекул. На Фиг. 1 представлен анализ делеции С-конца у мини-ловушки VEGF в различные промежуточные моменты времени с использованием масс-спектрометрии интактных молекул. Как показано на Фиг. 1, в момент времени T<sub>1</sub> наблюдалась делеция одного остатка глицина (G) из мини-ловушки VEGF. В момент

времени T4 наблюдались делеции глицина (G), лейцина-глицина (LG) и лейцина-лейцина-глицина (LLG). В момент времени T8 наблюдались делеции лейцина-лейцина-глицина (LLG). Сбор данных проводили до момента времени T16. В момент времени T16 дополнительного расщепления не наблюдалась. Результаты указывают на наличие ступенчатого отщепления С-концевых остатков мини-ловушки VEGF ферментативными БКХ.

Проводили иммунопреципитацию в качестве способа профилирования для идентификации БКХ, вызывающих ступенчатую делецию С-конца мини-ловушки VEGF. Для обогащения БКХ использовали покрытые стрептавидином Dynabeads (магнитные шарики) и биотинилированные анти-БКХ F550 антитела. Фиг. 2 показывает использование иммунопреципитации в качестве способа профилирования для идентификации БКХ. Карбоксипептидаза G3H8V5 была идентифицирована как участвующая в ступенчатом отщеплении С-концевых остатков мини-ловушки VEGF методами иммунопреципитации и ЖХ-МС/МС анализа. Более конкретно, добавляли 5 мкл 1 М уксусной кислоты к 10 мг образца белка и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Добавляли 110 мкл 10x TBS и 20 мкл избытка 1 М Tris-HCl (pH 8), чтобы вернуть значение pH 7,5, затем немедленно добавляли 25 мкг биотинилированного анти-БКХ антитела F550 к каждому образцу. Образцы инкубировали при осторожном покачивании при 4°C в течение ночи. После промывки добавляли к каждому образцу 1,5 мг магнитных шариков и суспендировали в 1x TBS и инкубировали при комнатной температуре при осторожном вращении в течение 2 часов. Шарики затем промывали HBS-T и 1x TBS и элюировали 100 мкл 50% ацетонитрила, 0,1 М уксусной кислоты в воде MilliQ встряхиванием при 800 об/мин в течение 5 минут два раза. Каждый образец антитела высушивали и ресуспендировали в 20 мкл денатурирующего и восстанавливающего раствора мочевины (8М мочевины, 10 мМ DTT, 0,1 М Tris-HCl, pH 7,5), и инкубировали при 500 об/мин при 56°C в течение 30 минут. Затем добавляли к каждому образцу 6 мкл 50 мМ йодацетамида для смешивания и проведения реакции при комнатной температуре в темноте в течение 30 минут. Добавляли к каждому образцу 50 мкл 20 нг/мкл трипсина для расщепления при 37 °С, встряхивали при 750 об/мин в течение ночи. Подвергнутые гидролизу образцы подкисляли 4 мкл 10% муравьиной кислоты и переносили 20 мкл в стеклянные флаконы для ЖХ-МС/МС анализа. Остаток образца хранили при -80 °С.

Карбоксипептидаза представляет собой БКХ, который обычно может присутствовать в лекарственных субстанциях. Карбоксипептидаза G3H8V5 представляет собой карбоксипептидазу серинового типа, которая может катализировать гидролиз пептидной связи путем отщепления не более трех аминокислотных остатков на С-конце белкового субстрата. Механизм расщепления карбоксипептидазы G3H8V5 включает кислотный остаток, такой как остаток аспартата или остаток глутамата. Присутствие карбоксипептидазы G3H8V5 дополнительно определяли количественно с использованием как обогащенных иммунопреципитацией образцов, так и необогащенных образцов, как

указано в Таблице 1. Площади пиков 3 наиболее часто встречающихся пептидов G3H8V5, включая GAGHMOVPTDKPR [m/z 633,3246<sup>2+</sup>], LFPEYK [m/z 398,7156<sup>2+</sup>] и LYQSMNSQYLK [m/z 687,8397<sup>2+</sup>], были использованы для сравнения с площадями пиков контрольных hPLBD2 (белок-хозяин, предположительно фосфолипаза В-подобный 2 человека) пептидов GLEDSYEGR [m/z 1139,3698<sup>2+</sup>], QNLDPPVSR [m/z 1139,3690<sup>2+</sup>] и SVLLDAASGQLR [m/z 1448,4735<sup>2+</sup>] для количественного определения карбоксипептидазы после обогащения иммунопреципитацией (IP), и показали концентрацию 15 ppm. Необогатенные образцы были подвергнуты количественному определению путем прямого расщепления с последующим методом PRM (мониторинг параллельных реакций) с использованием площадей пиков 3 наиболее часто встречающихся пептидов карбоксипептидазы GAGHMOVPTDKPR [m/z 633,3246<sup>2+</sup>], LFPEYK [m/z 398,7156<sup>2+</sup>] и LYQSMNSQYLK [m/z 687,8397<sup>2+</sup>] по сравнению с площадями пиков 3 наиболее часто встречающихся пептидов мини-ловушки VEGF FLSTLTIDGVTR [m/z 661,8694<sup>2+</sup>], SDQGLYTCAASSGLMTK [m/z 895,4084<sup>2+</sup>] и SDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGR [m/z 1397,6624<sup>2+</sup>], и показали концентрацию 24,5 ppm.

Таблица 1. Количественное определение карбоксипептидазы G3H8V5.

Карбоксипептидаза G3H8V5	Мини-ловушка VEGF	hPLBD2
Образец после иммунопреципитации		15 ppm
Необогатенный образец	24,5 ppm	

### Пример 2. Подтверждение активности карбоксипептидазы в образце мини-ловушки VEGF

Активность карбоксипептидазы, присутствующей в виде примесей БКХ в образцах мини-ловушки VEGF, была дополнительно подтверждена с использованием другого белкового субстрата, фрагмента F(ab')<sub>2</sub> MAB1. Моноклональное антитело MAB1 расщепляли с использованием FabRICATOR®, например, цистеиновой протеазы IdeS для получения специфического фрагмента F(ab')<sub>2</sub>, который имеет схожие С-концевые остатки с мини-ловушкой VEGF. Цистеиновая протеаза IdeS может расщеплять антитела в специфическом сайте следом за шарниром с образованием фрагментов F(ab')<sub>2</sub> и Fc/2. Такой специфический фрагмент F(ab')<sub>2</sub> содержит на своем С-конце определенную область, которая служит субстратом для расщепления карбоксипептидазой. Образец мини-ловушки VEGF и фрагмент F(ab')<sub>2</sub> MAB1 смешивали в соотношении 1:1, причем образец мини-ловушки VEGF содержал примеси БКХ. Смесь инкубировали при 37°C в течение около 2 недель или дольше. Образцы для тестирования отбирали в различные промежуточные моменты времени, такие как нулевой день (T<sub>0</sub>), третий день (T<sub>3</sub>), пятый день (T<sub>5</sub>) или десятый день (T<sub>10</sub>), и анализировали с использованием масс-спектрометрии интактных молекул. На Фиг. 3 показан анализ делеции С-конца фрагмента F(ab')<sub>2</sub> MAB1 в различные промежуточные моменты времени с использованием масс-спектрометрии интактных молекул. Как показано на Фиг. 3, делеции глицина (G), лейцина-глицина (LG)

и фенилаланина-лейцина-глицина (FLG) наблюдались в моменты времени T3 и T5 в различных соотношениях. Делеции фенилаланина-лейцина-глицина (FLG) наблюдались в момент времени T10. Результаты указывают на присутствие ступенчатого отщепления C-концевых остатков фрагмента F(ab')<sub>2</sub> MAB1 карбоксипептидазой. Результаты показывают, что карбоксипептидаза в примесях БКХ отщепляет C-концы как у мини-ловушки VEGF, так и у фрагмента F(ab')<sub>2</sub> MAB1, причем примеси БКХ присутствовали в мини-ловушке образца VEGF.

Фрагмент F(ab')<sub>2</sub> MAB1 и рекомбинантную карбоксипептидазу смешивали для дополнительных исследований механизмов расщепления карбоксипептидазой. Смесь инкубировали при 37°C в течение примерно 2 недель или дольше. Образцы для тестирования отбирали в различные промежуточные моменты времени, такие как нулевой день (T0), третий день (T3), пятый день (T5) или десятый день (T10), и анализировали с использованием масс-спектрометрии интактных молекул. Фиг. 4 показывает анализ делеции C-конца фрагмента F(ab')<sub>2</sub> MAB1 рекомбинантной карбоксипептидазой в различные промежуточные моменты времени с использованием масс-спектрометрии интактных молекул. Как показано на Фиг. 4, делеции глицина (G), лейцина-глицина (LG) и фенилаланина-лейцина-глицина (FLG) наблюдались в моменты времени T3 и T5 в различных соотношениях. Делеции фенилаланина-лейцина-глицина (FLG) наблюдались в момент времени T10. Результаты указывают на ступенчатое отщепление C-концевых остатков фрагмента F(ab')<sub>2</sub> MAB1 рекомбинантной карбоксипептидазой.

### **Пример 3. Идентификация сайтов связывания с использованием масс-спектрометрии водородного обмена (HX-MS)**

Масс-спектрометрия водородного обмена (HX-MS) была использована для идентификации сайта связывания карбоксипептидазы в мини-ловушке VEGF для понимания механизмов связывания и расщепления карбоксипептидазой G3H8V5. Дополнительно были исследованы положение и аминокислотные последовательности сайта связывания карбоксипептидазы G3H8V5 в мини-ловушке VEGF. Поскольку воздействие на белковую молекулу оксида дейтерия может вызвать быстрый обмен амидного Н на амидный D в неупорядоченных областях с отсутствующими стабильными водородными связями (Konermann et al.) или в незащищенных областях, измерения включения дейтерия в специфические сайты белковых молекул могут проводиться с использованием масс-спектрометрии (МС) вследствие массовых сдвигов.

Образец мини-ловушки VEGF, содержащий карбоксипептидазу, готовили в растворе с добавлением оксида дейтерия для проведения реакции водородного обмена, например, реакции с дейтеро/водородным обменом. Образец инкубировали с оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов при комнатной температуре. Затем реакцию водородного обмена гасили путем доведения рН до около 2,3 и/или доведения температуры до около 0 °С. После гашения реакции водородного обмена, образец подвергали протеолизу, такому как расщепление трипсином, для получения пептидной смеси. Пептидную смесь вводили в систему жидкостной хроматографии,

которая была сопряжена в режиме онлайн с масс-спектрометром. Определяли и анализировали данные молекулярного веса пептидной смеси. Затем определяли положение и относительные количества дейтериевых обменов в пептидной смеси и анализировали с использованием данных МС на основе массовых сдвигов пептидов. Поскольку ядро дейтерия вдвое тяжелее ядра водорода, пептидная молекула становится тяжелее при замене ее водорода на дейтерий.

Проводили измерения скорости водородного обмена амидов основной цепи белкового комплекса, содержащего мини-ловушку VEGF и карбоксипептидазу, для исследования структуры, динамических характеристик и взаимодействий белкового комплекса. В структурах белкового комплекса, скорости водородного обмена различаются на несколько порядков величины, поскольку скорость водородного обмена была функцией доступности растворителя и образования водородных связей. Амидные водороды на поверхности белкового комплекса демонстрировали высокие скорости водородного обмена. Амидные водороды, расположенные в сайте связывания между двумя белковыми молекулами в стабильных структурах белкового комплекса, демонстрировали недетектируемые или низкие скорости водородного обмена. В заглубленных областях белковой молекулы амидные гидрогены этой области были защищены от водородного обмена. На Фиг. 5 представлена трехмерная структура белкового комплекса, содержащего мини-ловушку VEGF и карбоксипептидазу, на основе результатов анализа методом НХ-МС. Как показано на Фиг. 5, в мини-ловушке VEGF была идентифицирована область с сильной защитой, которая указывает на сайт связывания карбоксипептидазы. Аминокислоты, участвующие в сайте связывания, представляли собой аминокислоты в положениях 170-186 мини-ловушки VEGF, с последовательностью LTIDGVTRSDQGLYTCA. Остаток глутамата в мини-ловушке VEGF был идентифицирован по его участию в отщеплении трех аминокислотных остатков на С-конце мини-ловушки VEGF карбоксипептидазой.

Успешная идентификация сайта связывания и механизма отщепления карбоксипептидазы может привести к разработке способа устранения С-концевого отщепления мини-ловушки VEGF. Специфический остаток глутамата, участвующий в механизме расщепления, может быть мутирован на основную или нейтральную аминокислоту для устранения расщепления мини-ловушки VEGF карбоксипептидазой. Кроме того, идентифицированный сайт связывания может быть заблокирован для устранения расщепления мини-ловушки VEGF карбоксипептидазой с использованием генной мутации, нокаута, химической модификации, ферментативной модификации или их комбинаций.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ идентификации сайта связывания между белком, представляющим интерес, и вторым белком, включающий:

инкубацию образца, содержащего белок, представляющий интерес, и указанного второго белка с оксидом дейтерия;

добавление гидролизующего агента к образцу для получения смеси с по меньшей мере одним продуктом гидролиза;

определение данных молекулярного веса указанного по меньшей мере одного продукта гидролиза в указанной смеси с использованием масс-спектрометра; и

сопоставление указанных данных молекулярного веса указанного по меньшей мере одного продукта гидролиза с данными, полученными для по меньшей мере одного известного белкового стандарта.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный второй белок представляет собой белок клетки-хозяина.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный образец инкубируют с оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что образец инкубируют при комнатной температуре.

5. Способ по п. 1, дополнительно включающий гашение указанного образца путем доведения рН до около 2,3.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий гашение образца путем доведения температуры до около 0 °С.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную смесь вводят в систему жидкостной хроматографии.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что указанная система жидкостной хроматографии связана в режиме онлайн с масс-спектрометром.

9. Способ по п. 7, отличающийся тем, что масс-спектрометр сопряжен с указанной системой жидкостной хроматографии.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный второй белок способен расщеплять указанный белок, представляющий интерес.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанное расщепление затрагивает кислотный остаток.

12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что указанное расщепление затрагивает остаток аспартата или остаток глутамата.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный второй белок представляет собой карбоксипептидазу.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный второй белок представляет собой карбоксипептидазу серинового типа.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный белок, представляющий интерес, представляет собой VEGF-связывающий белок или мини-ловушку VEGF.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный белок, представляющий интерес, представляет собой Fab или F(ab')<sub>2</sub>, полученный с использованием цистеиновой протеазы IdeS.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный белок, представляющий интерес, представляет собой белковый фармацевтический продукт, антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

18. Способ модификации белка, представляющего интерес, для устранения расщепления белка, представляющего интерес, вторым белком, включающий:

идентификацию остатка, задействованного в механизме расщепления белка, представляющего интерес, вторым белком, путем:

инкубации образца, содержащего указанный белок, представляющий интерес, и указанный второй белок, с оксидом дейтерия,

добавления гидролизующего агента к указанному образцу для получения смеси с по меньшей мере одним продуктом гидролиза,

определения данных молекулярного веса указанного по меньшей мере одного продукта гидролиза в указанной смеси с использованием масс-спектрометра, и

сопоставления указанных данных молекулярного веса указанного по меньшей мере одного продукта гидролиза с данными, полученными для по меньшей мере одного известного белкового стандарта; и

мутирование идентифицированного остатка во второй остаток для устранения расщепления белка, представляющего интерес, вторым белком.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный второй белок представляет собой белок клетки-хозяина.

20. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный образец инкубируют с оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов.

21. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанную смесь вводят в систему жидкостной хроматографии.

22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанная система жидкостной хроматографии связана в режиме онлайн с масс-спектрометром.

23. Способ по п. 21, отличающийся тем, что масс-спектрометр сопряжен с указанной системой жидкостной хроматографии.

24. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный второй белок способен расщеплять указанный белок, представляющий интерес.

25. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанное расщепление затрагивает кислотный остаток.

26. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанное расщепление затрагивает остаток аспартата или остаток глутамата.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанный остаток представляет собой аспартат и мутирует в основную аминокислоту или нейтральную аминокислоту.

28. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанный остаток представляет собой глутамат и мутирует в основную аминокислоту или нейтральную аминокислоту.

29. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный второй белок представляет собой карбоксипептидазу.

30. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный второй белок представляет собой карбоксипептидазу серинового типа.

31. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный белок, представляющий интерес, представляет собой VEGF-связывающий белок или мини-ловушку VEGF.

32. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный белок, представляющий интерес, представляет собой Fab или F(ab')<sub>2</sub>, полученный с использованием цистеиновой протеазы IdeS.

33. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный белок, представляющий интерес, представляет собой белковый фармацевтический продукт, антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

34. Способ модификации белка, представляющего интерес, для устранения расщепления белка, представляющего интерес, вторым белком, включающий:

идентификацию сайта связывания между указанным белком, представляющим интерес, и указанным вторым белком, путем:

инкубации образца, содержащего указанный белок, представляющий интерес, и указанный второй белок, с оксидом дейтерия,

добавления гидролизующего агента к указанному образцу для получения смеси, содержащей по меньшей мере один продукт гидролиза,

определения данных молекулярного веса указанного по меньшей мере одного продукта гидролиза с использованием масс-спектрометра, и

сопоставления указанных данных молекулярного веса указанного по меньшей мере одного продукта гидролиза с данными, полученными для по меньшей мере одного известного белкового стандарта, для идентификации сайта связывания; и

блокирование указанного идентифицированного сайта связывания для устранения расщепления указанного белка, представляющего интерес, указанным вторым белком.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный второй белок представляет собой белок клетки-хозяина.

36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный образец инкубируют с оксидом дейтерия в течение от около 60 секунд до около 24 часов.

37. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанную смесь вводят в систему жидкостной хроматографии.

38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что указанная система жидкостной хроматографии связана в режиме онлайн с масс-спектрометром.

39. Способ по п. 37, отличающийся тем, что масс-спектрометр сопряжен с указанной системой жидкостной хроматографии.

40. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный второй белок способен расщеплять указанный белок, представляющий интерес.

41. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанное расщепление затрагивает кислотный остаток.

42. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанное расщепление затрагивает остаток аспартата или остаток глутамата.

43. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный второй белок представляет собой карбоксипептидазу.

44. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный второй белок представляет собой карбоксипептидазу серинового типа.

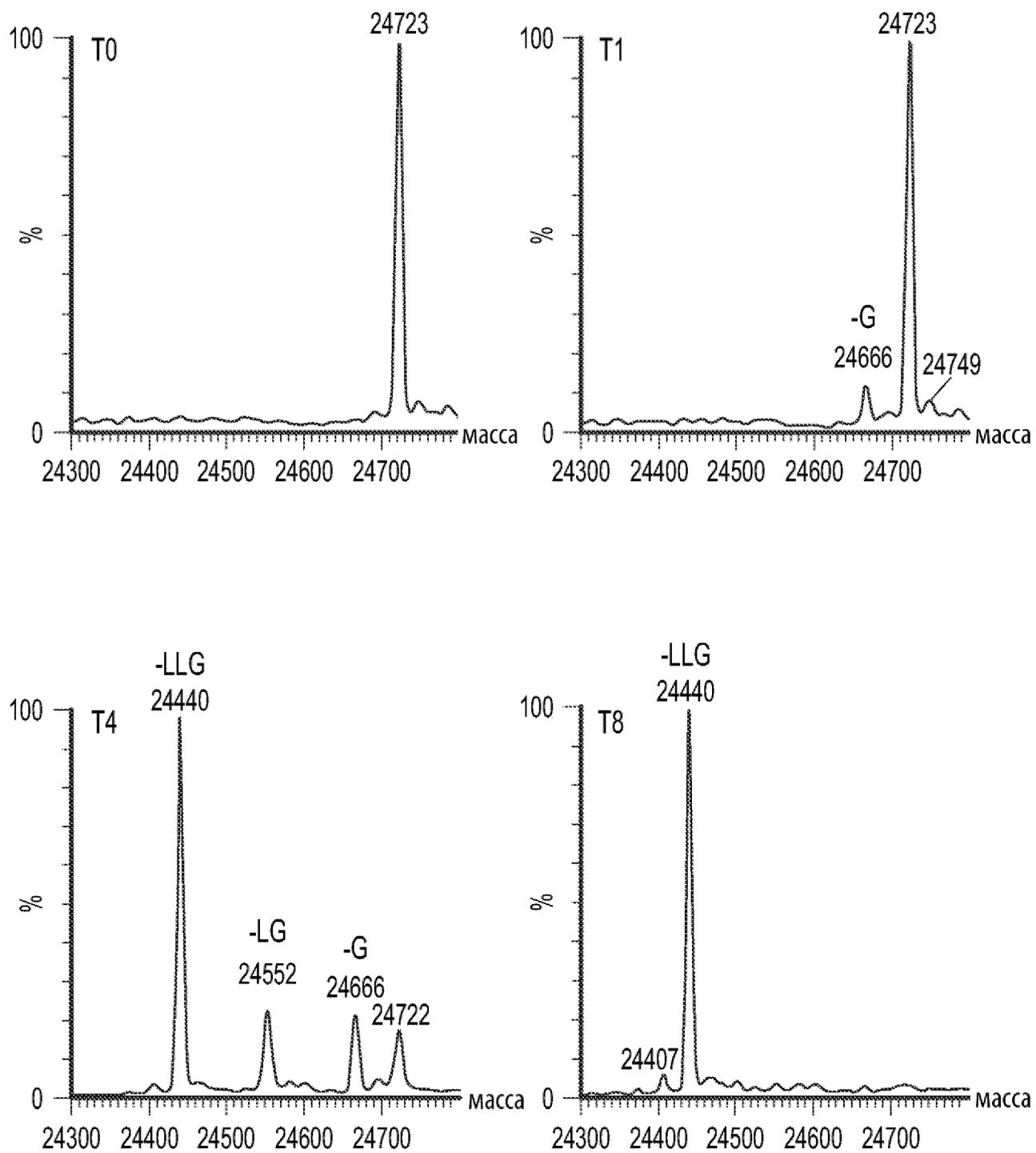
45. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный белок, представляющий интерес, представляет собой VEGF-связывающий белок или мини-ловушку VEGF.

46. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный белок, представляющий интерес, представляет собой Fab или F(ab')<sub>2</sub>, полученный с использованием цистеиновой протеазы IdeS.

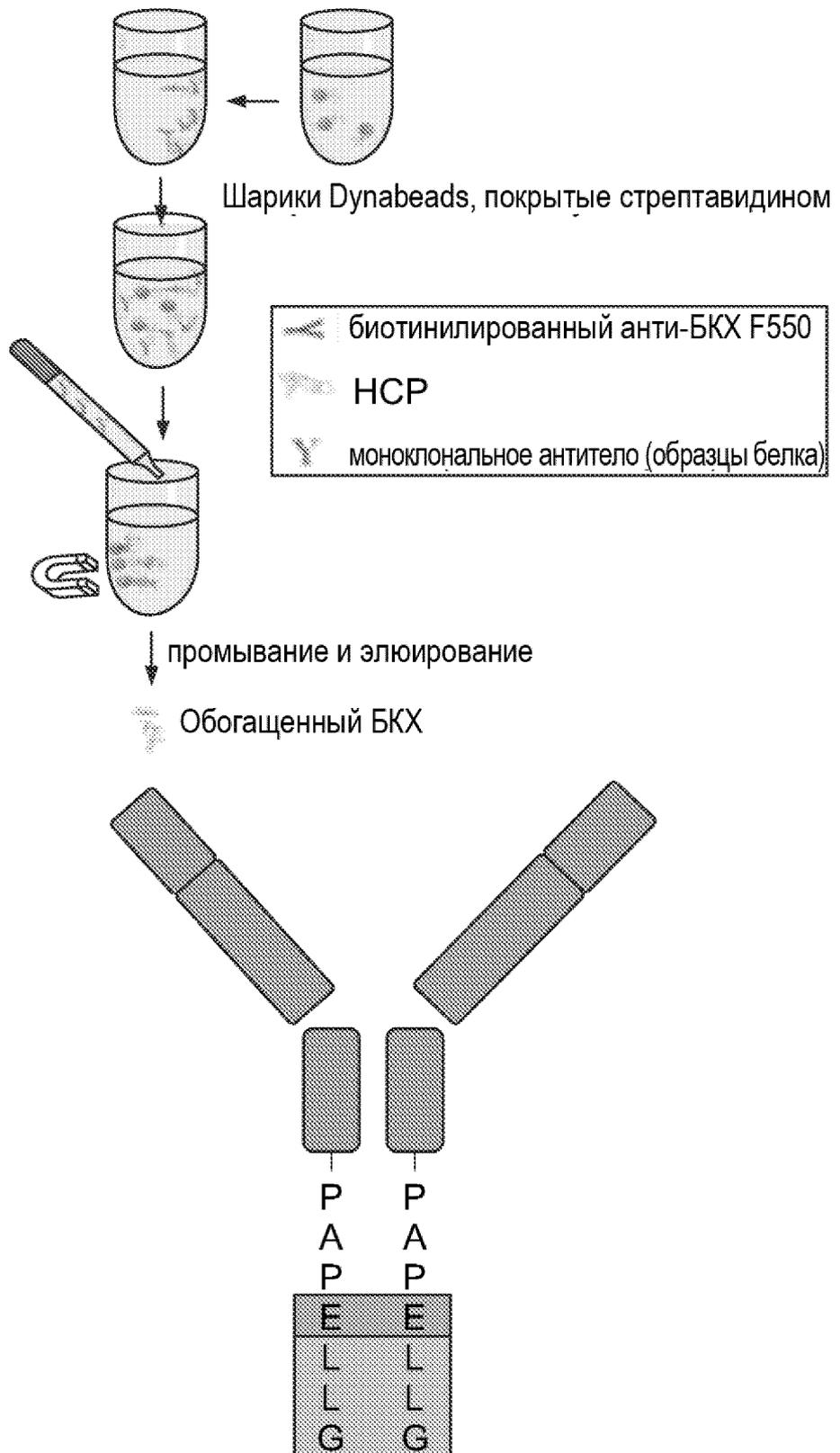
47. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный белок, представляющий интерес, представляет собой белковый фармацевтический продукт, антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

48. Способ по п. 34, дополнительно включающий блокирование указанного идентифицированного сайта связывания с использованием генной мутации, нокаута, химической модификации, ферментативной модификации, или их комбинаций.

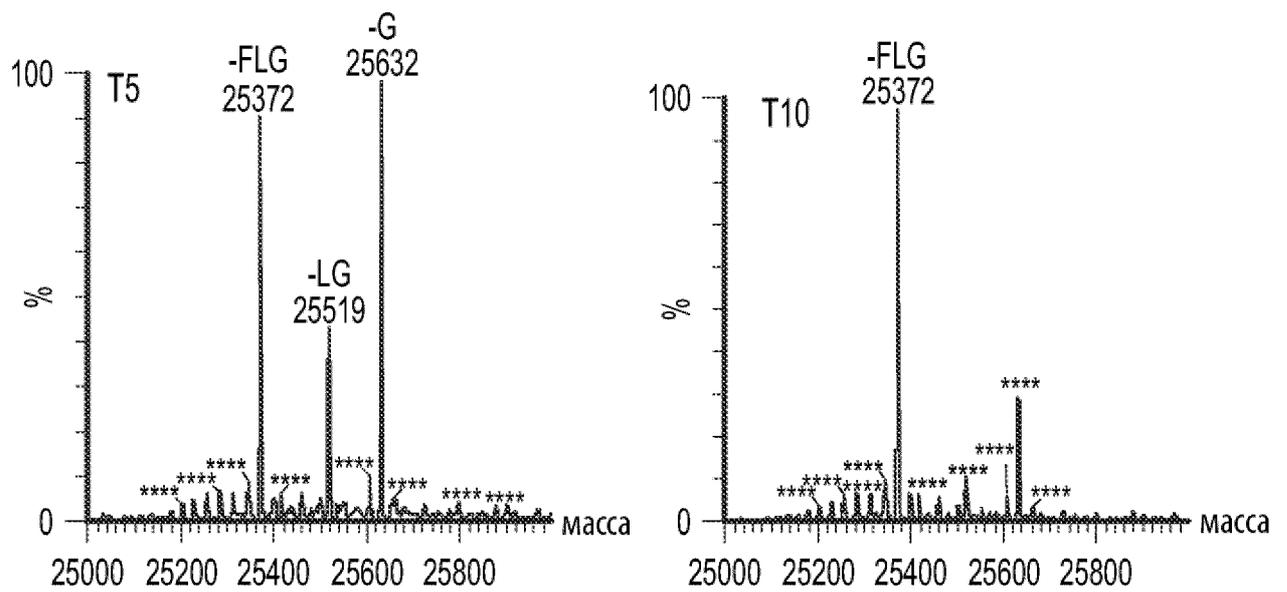
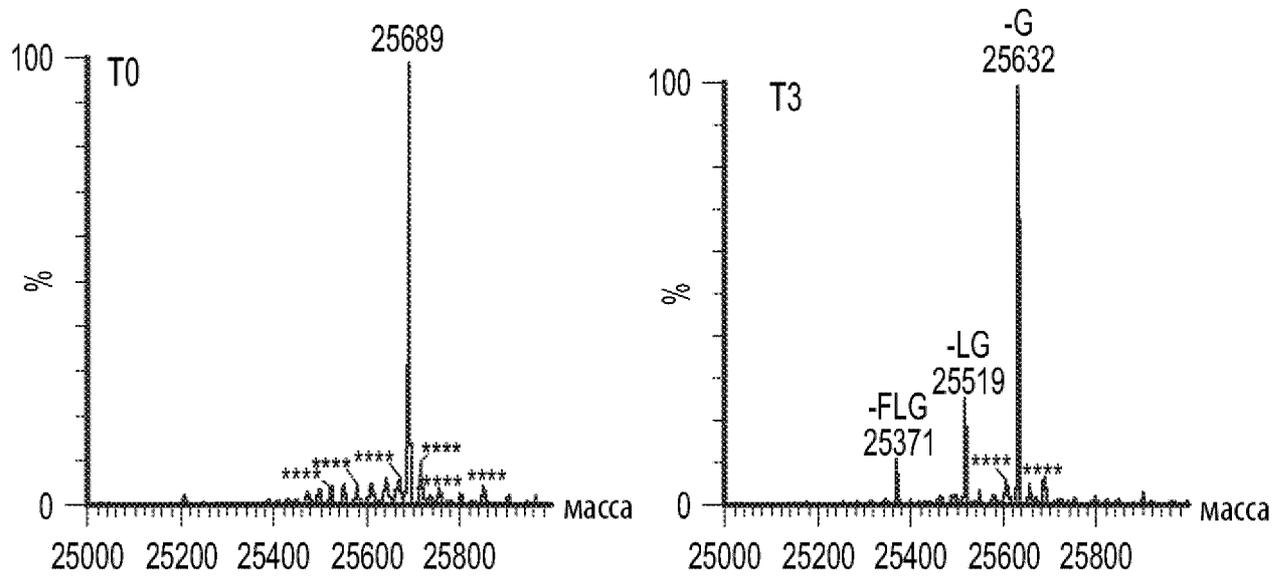
По доверенности



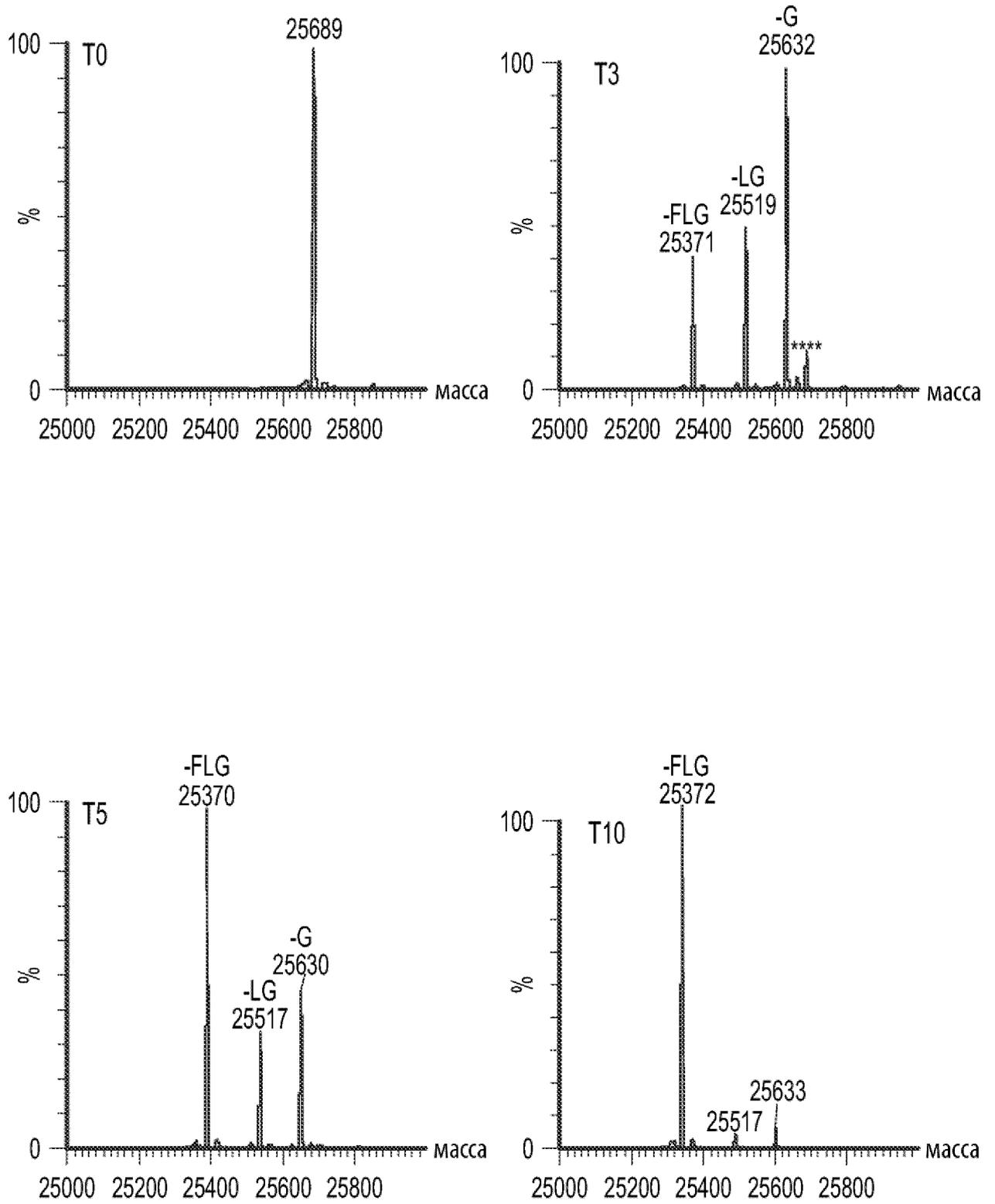
Фиг. 1



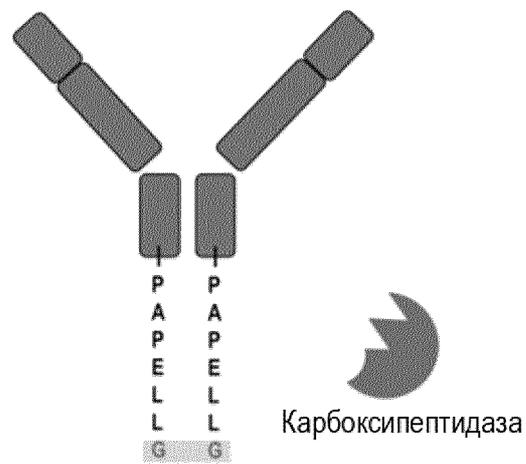
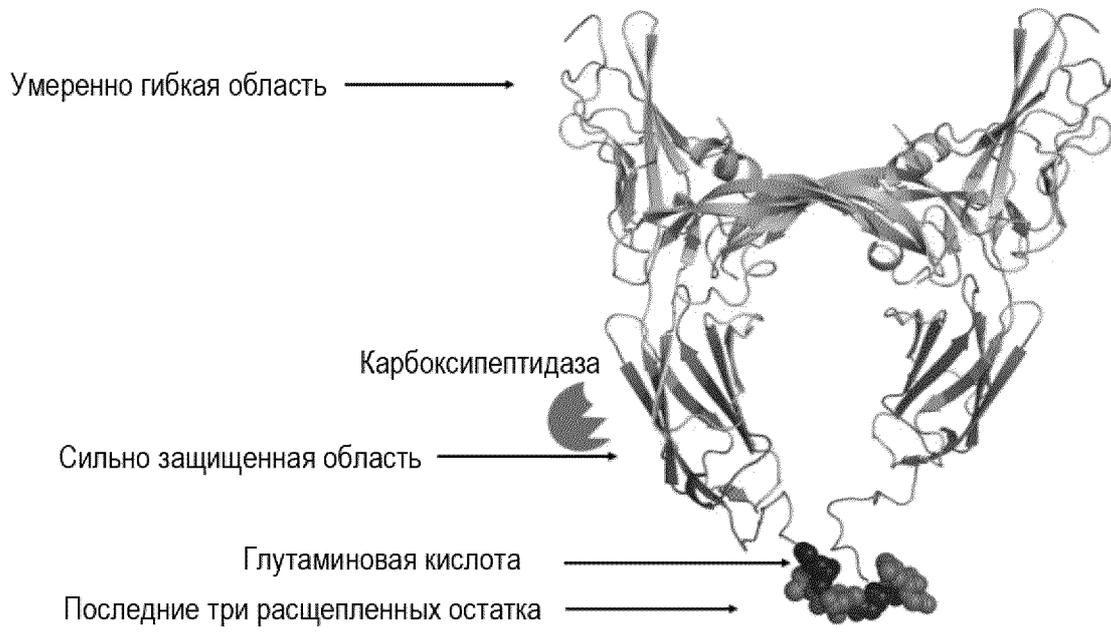
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5