

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392098 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.16

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

(22) Дата подачи заявки
2022.02.25

(54) ДИССОЦИАЦИЯ ПРИ ПЕРЕНОСЕ ЭЛЕКТРОНА И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ УЛУЧШЕННОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

(31) 63/153,886

(32) 2021.02.25

(33) US

(86) PCT/US2022/017935

(87) WO 2022/183010 2022.09.01

(71) Заявитель:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

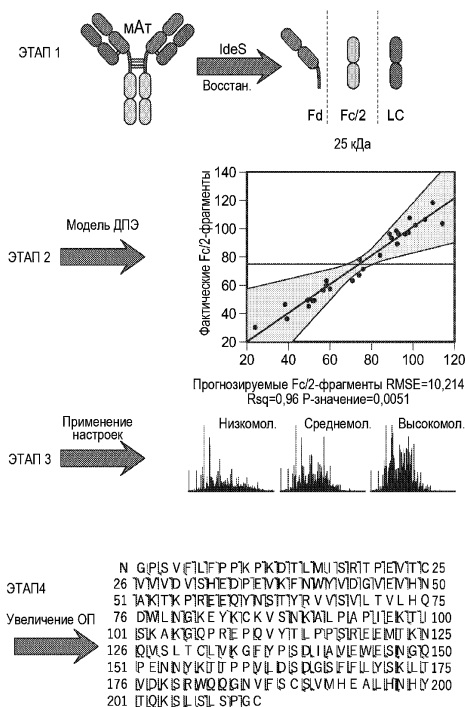
(72) Изобретатель:

Чжэн Сяоцин, Седжков Милос, Грир
Тайлер, О'Брайен Джонсон Рейд (US)

(74) Представитель:

Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)

(57) В данном изобретении предложен усовершенствованный способ точной оценки аминокислотной последовательности терапевтического белка, в частности антитела, для обеспечения гомогенности белка для того, чтобы он был пригоден для введения человеку при лечении заболевания или расстройства. В способах используются подходы аналитической физической химии, в частности способ управляемой диссоциации при переносе электрона (ДПЭ) и масс-спектрометрия (МС), для надежного охвата последовательности молекулы с высокой точностью и скоростью использования.



202392098

A1

A1

202392098

ДИССОЦИАЦИЯ ПРИ ПЕРЕНОСЕ ЭЛЕКТРОНА И МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ ДЛЯ УЛУЧШЕННОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ БЕЛКОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[1] Данная заявка заявляет приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/153,886, поданной 25 февраля 2021 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[2] Аспекты данного изобретения, в целом, относятся к способам определения точности последовательностей антител. Более конкретно, в данном изобретении предложены способы аналитической физической химии, критерии отбора белковых фрагментов и многофакторный анализ для достижения более высокой точности последовательности и охвата с помощью использования диссоциации при переносе электрона (ДПЭ) и масс-спектрометрии (МС).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Терапевтические препараты на основе моноклональных антител (мАт) благодаря их высокой специфичности и предпочтительным фармакокинетическим свойствам остаются основной силой на рынке биофармацевтических препаратов (Walsh, 2018, *Nat Biotechnol*, 36:1136-1145; Karlon *et al.*, 2020, *Mabs*, 12:1703531; Mould and Meibohm, 2016, *BioDrugs*, 30:275-293). Из-за важности гликозилирования и дисульфидных связей для правильного функционирования моноклональных антител (мАт) они часто продуцируются в системах клеток млекопитающих.

[4] Однако известно, что помимо применения модификаций, необходимых для функционирования мАт, получение в системах клеток млекопитающих приводит к гетерогенности продукта Meibohm *et al.*, 2019, *Pharmaceutical Biotechnology Fundamentals and Applications*, 5th ed.). Поскольку микрогетерогенность посттрансляционной модификации (ПТМ) может влиять на важные характеристики качества терапевтических мАт, включая стабильность, растворимость, фармакодинамические и фармакокинетические свойства, регулирующим органам требуется обширная аналитическая характеристика для обеспечения качества и однородности продукта (Meibohm *et al.*).

[5] Способы масс-спектрометрии (МС), особенно МС «top-down» («сверху-вниз») и «bottom-up» («снизу-вверх»), оказались мощными инструментами для структурной характеристики антител. Каждый подход предоставляет уникальную информацию о структуре белка и потенциальных посттрансляционных модификациях (Fornelli *et al.*, 2018, *Anal Chem*, 90:8421-8429; Wang *et al.*, 2019, *Sci Rep*, 9:2345). Масс-спектрометрию можно использовать в сочетании с жидкостной хроматографией, например, можно использовать жидкостную хроматографию с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) или жидкостную хроматографию с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС² или ЖХ-МС/МС), для дополнительного улучшения способности охарактеризовывать аналиты, например антитела.

[6] МС «top-down» сочетает в себе интактный масс-спектрометрический анализ с tandemной масс-спектрометрией (МС²), не требует ферментативного расщепления и предоставляет обширную информацию, касающуюся, например, посттрансляционных модификаций, структуры белка и взаимодействия лекарственного средства с мишенью (Donnelly *et al.*, 2019, *Nat Methods*, 16:587-594). Однако МС² «top-down» больших биофармацевтических препаратов, таких как антитела, имеет ограничения. Главным из них является огромный размер больших молекул, который ограничивает охват последовательностей, возможный без какой-либо ферментативной обработки (Fornelli *et al.*).

[7] МС «bottom-up» представляет собой альтернативный подход, который может обеспечить охват последовательностей с разрешением на уровне аминокислот. Одним из недостатков этого способа является то, что высокий охват последовательностей достигается за счет тщательной подготовки образцов, включая, например, денатурацию белка, восстановление дисульфидов, алкилирование цистеина и/или ферментативное расщепление представляющего интерес белка (Nielsen *et al.*, 2008, *Nat Methods*, 5:459-460; Lippincott *et al.*, 1999, *Anal Biochem*, 267:57-64). МС «bottom-up» не только трудоемка, но и может привести к появлению артефактов химической модификации во время подготовки образцов. Из-за этого риска МС «bottom-up» требует исчерпывающей разработки для создания оптимизированного способа, который сводит к минимуму артефакты, вызванные подготовкой образца.

[8] МС «middle-down» представляет собой альтернативный подход к характеристике антител, который сочетает в себе преимущества МС-анализа типа «top-down» и типа «bottom-up» (Chait, 2006, *Science*, 314:65-66; Fornelli *et al.*, 2014, *Anal Chem*, 86:3005-3012; Tsybin *et al.*, 2011, *Anal Chem*, 83:8919-8927; Fornelli *et al.*, 2012, *Mol Cell Proteomics*, 11:1758-1767). При МС-анализе «middle-down» часто используется иммуноглобулин G-деградирующий фермент *S. pyogenes* (IdeS) для расщепления моноклонального антитела (мАт) на его субъединицы. МС-

анализ «middle-down» субъединиц мАт можно сочетать с диссоциацией при переносе электрона (ДПЭ), поскольку большие субъединицы, образованные при ограниченном расщеплении протеазами, обладают зарядом более +3, что является предпочтительным для фрагментарного анализа ДПЭ. Эти сильно заряженные ионы-предшественники в газовой фазе фрагментируются с помощью ДПЭ с образованием серий с- и z-ионов, которые раскрывают структурную информацию о белке, представляющем интерес, такую как аминокислотная последовательность и идентичность ПТМ (Mikesh *et al.*, 2006, *Biochim Biophys Acta, Proteins Proteomics*, 1764:1811-1822; Syka *et al.*, 2004, *PNAS*, 101:9528-9533; Zhurov *et al.*, 2013, *Chem Soc Rev*, 42:5014-5030).

[9] Поскольку фрагментация ионов-предшественников с помощью ДПЭ использует электроны с низкой энергией во время ион-ионных взаимодействий и протекает через экзотермический процесс, вызывающий расщепление основной цепи, лабильные ПТМ сохраняются в спектрах MS^2 , что позволяет их идентифицировать и локализовать на конкретной аминокислоте (Brodbelt, 2016, *Anal Chem*, 88:30-51). О фрагментации с помощью диссоциации при переносе электрона интактных моноклональных антител впервые сообщили Tsybin *et al.*, а о ДПЭ-фрагментации субъединиц моноклональных антител впервые сообщили Fornelli *et al.*

[10] Предыдущая работа по анализу «middle-down» с использованием ДПЭ продемонстрировала, что охват последовательности до 49% может быть достигнут для субъединицы Fc/2 за один прогон обращённо-фазовой жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ОФ-ВЭЖХ-МС), и что этот охват увеличился до 68% за счет объединения по меньшей мере шести прогонов ДПЭ (Fornelli *et al.* 2014). Совсем недавно было показано, что охват был дополнительно улучшен до 87% за счет интеграции в анализ трех прогонов ДПЭ (59,8%), одного прогона диссоциации при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии (ET_{hc}D) (51,7%) и двух прогонов ультрафиолетовой фотодиссоциации (УФФД, UVPD) (61,2%), сочетающих несколько способов фрагментации (Fornelli *et al.* 2018; Fornelli *et al.* 2014).

[11] Поскольку представленные в данное время на рынке масс-спектрометры предназначены для широкого спектра применений, требуется обширная оптимизация параметров прибора, чтобы найти оптимальные параметры для конкретного применения. Неудовлетворенной потребностью является способ определения оптимальных параметров для максимального охвата последовательностей субъединиц мАт с помощью ДПЭ-МС².

[12] Достижения в области масс-спектрометров и способов фрагментации, включая гибридные способы фрагментации и УФФД, пропорционально увеличили количество параметров прибора, которые должен учитывать аналитик. При наличии множества различных подходов и параметров для увеличения охвата последовательностей субъединиц антител поиск оптимального набора условий может стать серьезной проблемой. Для ДПЭ взаимодействия между многими доступными параметрами и то, как они влияют на снижение заряда, эффективность фрагментации и качество спектров МС², часто упускается из виду, а настройки, обычно используемые для анализа, часто основаны на устоявшейся теории, предыдущем опыте или опубликованных способах. Более современные масс-спектрометры, такие как Orbitrap Fusion Lumos Tribrid, содержат сложные процедуры калибровки для ДПЭ, но они выполняют анализ с использованием относительно небольших аналитов, таких как ангиотензин, и не являются репрезентативными для более крупных ионов, фрагментированных во время «top-down» или «middle-down» анализа больших белков. Кроме того, эти процедуры не учитывают все источники дрейфа нуля прибора, которые могут повлиять на образование фрагментов при ДПЭ и их последующее влияние на оптимальные параметры.

[13] Следовательно, необходим системный подход к оптимизации условий работы инструмента ДПЭ, который обеспечил бы максимальный охват последовательности при МС² и который можно было бы применять ко всем масс-спектрометрам.

[14] Соответственно, было бы желательно предложить простой способ точного и четкого секвенирования белка, в частности, антител и субъединиц антител.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[15] Таким образом, целью данного изобретения является применение подхода статистического планирования эксперимента (DOE), который можно использовать для определения оптимальных параметров диссоциации при переносе электрона (ДПЭ) для максимального охвата последовательностей субъединиц моноклонального антитела. Кроме того, этот способ можно применять к массиву терапевтических моноклональных антител для определения специфических для молекулы параметров, поскольку каждое антитело может фрагментироваться немного по-разному во время экспериментов по диссоциации при переносе электрона (ДПЭ).

[16] В частности, в данном изобретении предложены способы, подходящие для точного секвенирования *de novo* белков, таких как антитела или субъединицы антител, с

использованием ДПЭ и МС, например ЖХ-МС². Были определены и выбраны способы, предложенные DOE, такие как D-оптимальные настройки прибора.

[17] Одним из подходов к поиску оптимальных параметров ДПЭ-МС² является использование анализа планирования экспериментов (DOE), который позволяет проверять различные комбинации параметров, чтобы найти те, которые обеспечивают максимальный охват последовательности субъединицы. Вместо «однофакторной» (OFAT) оценки, которая неэффективна, учитывая количество параметров прибора МС, DOE позволяет одновременно оценивать множество различных параметров прибора.

[18] В частности, изоляционное окно m/z (отношение массы к заряду), время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ и мишень для АРУ-МС² (тандемной масс-спектрометрии с автоматической регулировкой усиления) являются важными параметрами, влияющими на спектральный состав ДПЭ-МС², и, следовательно, могут влиять на общий охват последовательностей субъединиц при МС².

[19] Чтобы уменьшить рабочую нагрузку и при этом иметь значимую модель, была принята D-оптимальная модель. D-оптимальная модель представляет собой компьютерное проектирование, в котором подмножество всех возможных комбинаций выбирается с целью максимизации D-эффективности DOE (de Aguiar *et al.*, 1995, *Chemom Intell Lab Syst*, 30:199-210). D-оптимальная модель может быть применена к ДПЭ для экстраполяции соответствующих параметров, которые контролируют охват последовательности при ДПЭ-МС² (используя в качестве основы группу параметров, выбранных пользователем, которые влияют на выбранный результат), оценки размера влияния каждого параметра и взаимодействия, прогнозирования отклика, возникающего в результате этих выбранных комбинаций параметров, и, в конечном итоге, определения улучшенных рабочих условий для достижения максимального охвата (Randall *et al.*, 2013, *J Am Soc Mass Spectrom*, 24:1501-1512; Kelstrup *et al.*, 2012, *J Proteom Res*, 11:3487-3497; Sun *et al.*, 2013, *Rapid Commun Mass Spectrom*, 27:157-162; Coffey and Yang, 2018, *Statistics for Biotechnology Process Development*).

[20] Таким образом, DOE является мощным математическим инструментом, который можно применять с использованием способа по данному изобретению для увеличения охвата последовательностей полипептида, например МАт или субъединицы МАт, в частности, при применении к анализу ДПЭ-МС².

[21] В данном изобретении также предложены белки, например, антитела, варианты или слияния антител, которые были секвенированы согласно способам по данному изобретению.

[22] Преимущества данного изобретения включают, но не ограничиваются, надежный и высокоточный анализ с использованием аналитической физической химии для высокоскоростного и точного секвенирования белков *de novo*, например, терапевтических антител; терапевтические антитела, полученные с более высоким уровнем достоверности последовательности в результате вышеизложенного, как часть производственного цикла; широкое применение для совершенствования производства антител в клинических разработках и в коммерческом использовании; более высокий охват последовательностей субъединиц моноклональных антител, чем при любом опубликованном подходе ДПЭ; более высокий охват последовательности с интактной информацией о ПТМ без артефактов образца, т. е. сохраняются лабильные ПТМ; более высокий охват последовательностей (ОП), например, улучшение на 19-26% по сравнению с известными способами и возможность достижения 100% ОП; и минимальные этапы, простота использования и более низкая стоимость.

[23] В данном изобретении предложен способ улучшения охвата последовательностей полипептида. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ включает (а) выбор по меньшей мере двух параметров для тандемной масс-спектрометрии, которые влияют на охват последовательности; и (б) использование D-оптимальной модели экспериментов для определения значения каждого из указанных по меньшей мере двух параметров, при этом указанное значение выбирают на основе максимального охвата последовательностей.

[24] В одном аспекте указанный полипептид представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, фрагмент антитела, субъединицу антитела, белок клетки-хозяина, фармацевтический белковый продукт или их расщепленный фрагмент.

[25] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает выполнение способа последовательно или параллельно для двух или более субъединиц полипептида. В конкретном аспекте указанные субъединицы выбраны из группы, включающей субъединицу Fc/2, Fd или LC антитела.

[26] В одном аспекте указанная тандемная масс-спектрометрия представляет собой «middle-down» масс-спектрометрию.

[27] В одном аспекте указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией нанозлектрораспылением или масс-спектрометр на основе Орбитрэпа.

[28] В одном аспекте указанная tandemная масс-спектрометрия включает диссоциацию при переносе электрона, диссоциацию, индуцированную столкновением, диссоциацию при переносе электрона с индуцированной столкновением диссоциацией, диссоциацию при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии, ультрафиолетовую фотодиссоциацию или их комбинацию. В другом аспекте указанная tandemная масс-спектрометрия включает автоматическую регулировку усиления.

[29] В одном аспекте указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии. В конкретном аспекте, указанная система жидкостной хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматография со смешанным режимом или их комбинацию.

[30] В одном аспекте указанные по меньшей мере два параметра выбирают из группы, включающей изоляционное окно m/z , время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС² и любую их комбинацию.

[31] В данном изобретении также предложен способ определения аминокислотной последовательности полипептида. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ включает (a) определение значения по меньшей мере двух параметров для tandemной масс-спектрометрии полипептида с использованием D-оптимальной модели экспериментов, при этом указанное значение выбирают на основе максимального охвата последовательности; и (b) подвергание указанного полипептида tandemному масс-спектрометрическому анализу с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для определения аминокислотной последовательности указанного полипептида.

[32] В одном аспекте указанный полипептид представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, фрагмент антитела, субъединицу антитела, белок клетки-хозяина, фармацевтический белковый продукт или их расщепленный фрагмент.

[33] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает выполнение способа последовательно или параллельно для двух или более субъединиц полипептида. В конкретном аспекте указанные субъединицы выбраны из группы, включающей субъединицу Fc/2, Fd или LC антитела.

[34] В одном аспекте указанная tandemная масс-спектрометрия представляет собой «middle-down» масс-спектрометрию.

[35] В одном аспекте указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр на основе Орбитрэпа. В другом аспекте указанная tandemная масс-спектрометрия включает диссоциацию при переносе электрона, диссоциацию, индуцированную столкновением, диссоциацию при переносе электрона с индуцированной столкновением диссоциацией, диссоциацию при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии, ультрафиолетовую фотодиссоциацию или их комбинацию. В дополнительном аспекте указанная tandemная масс-спектрометрия включает автоматическую регулировку усиления.

[36] В одном аспекте указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии. В конкретном аспекте, указанная система жидкостной хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматография со смешанным режимом или их комбинацию.

[37] В одном аспекте указанные по меньшей мере два параметра выбирают из группы, включающей изоляционное окно m/z , время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС² и любую их комбинацию.

[38] В одном аспекте способ дополнительно включает ферментативное расщепление указанного полипептида перед анализом с помощью tandemной масс-спектрометрии. В конкретном аспекте указанное ферментативное расщепление включает контактирование указанного полипептида с IdeS. В другом аспекте способ дополнительно включает восстановление указанного полипептида перед анализом с помощью tandemной масс-спектрометрии.

[39] В одном аспекте способ дополнительно включает независимое выполнение указанного способа два или более раз и объединение идентифицированных фрагментов из каждого анализа tandemной масс-спектрометрии для определения аминокислотной последовательности указанного полипептида.

[40] В данном изобретении предложен дополнительный способ улучшения охвата последовательностей полипептида. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ включает (а) выбор по меньшей мере двух параметров для

тандемной масс-спектрометрии, влияющих на количество фрагментов каждого из набора различных размеров фрагментов; и (b) использование D-оптимальной модели экспериментов для определения значения каждого из указанных по меньшей мере двух параметров, при этом указанное значение выбирают на основе получения наибольшего количества фрагментов для каждого из указанных выбранных размеров фрагментов.

[41] В одном аспекте указанный полипептид представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, фрагмент антитела, субъединицу антитела, белок клетки-хозяина, фармацевтический белковый продукт или их расщепленный фрагмент.

[42] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает выполнение способа последовательно или параллельно для двух или более субъединиц полипептида. В конкретном аспекте указанные субъединицы выбраны из группы, включающей субъединицу Fc/2, Fd или LC антитела.

[43] В одном аспекте указанная тандемная масс-спектрометрия представляет собой «middle-down» масс-спектрометрию.

[44] В одном аспекте указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией нанозлектрораспылением или масс-спектрометр на основе Орбитрэпа.

[45] В одном аспекте указанная тандемная масс-спектрометрия включает диссоциацию при переносе электрона, диссоциацию, индуцированную столкновением, диссоциацию при переносе электрона с индуцированной столкновением диссоциацией, диссоциацию при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии, ультрафиолетовую фотодиссоциацию или их комбинацию. В другом аспекте указанная тандемная масс-спектрометрия включает автоматическую регулировку усиления.

[46] В одном аспекте указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии. В конкретном аспекте, указанная система жидкостной хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматография со смешанным режимом или их комбинацию.

[47] В одном аспекте указанные по меньшей мере два параметра выбирают из группы, включающей изоляционное окно m/z , время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС² и любую их комбинацию.

[48] В одном аспекте указанные размеры фрагментов выбирают из группы, содержащей фрагменты размером менее около 5000 Да, фрагменты размером от около 5000 Да до около 10000 Да и фрагменты размером более около 10000 Да.

[49] В данном изобретении дополнительно предложен другой способ определения аминокислотной последовательности полипептида. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ включает (а) определение значения по меньшей мере двух параметров для тандемной масс-спектрометрии полипептида с использованием D-оптимальной модели экспериментов, при этом указанное значение выбирают на основе получения наибольшего количества фрагментов для каждого из набора различных размеров фрагментов; (b) подвергание указанного полипептида анализу с помощью тандемной масс-спектрометрии с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для каждого выбранного размера фрагментов; и (с) объединение идентифицированных фрагментов из указанного анализа тандемной масс-спектрометрии с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для каждого выбранного размера фрагментов для определения аминокислотной последовательности указанного полипептида.

[50] В одном аспекте указанный полипептид представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, фрагмент антитела, субъединицу антитела, белок клетки-хозяина, фармацевтический белковый продукт или их расщепленный фрагмент.

[51] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает выполнение способа последовательно или параллельно для двух или более субъединиц полипептида. В конкретном аспекте указанные субъединицы выбраны из группы, включающей субъединицу Fc/2, Fd или LC антитела.

[52] В одном аспекте указанная тандемная масс-спектрометрия представляет собой «middle-down» масс-спектрометрию.

[53] В одном аспекте указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией нанoeлектрораспылением или масс-спектрометр на основе Орбитрэпа. В другом аспекте указанная тандемная масс-спектрометрия включает диссоциацию при переносе электрона, диссоциацию, индуцированную столкновением, диссоциацию при переносе электрона с индуцированным столкновением диссоциацией, диссоциацию при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии, ультрафиолетовую

фотодиссоциацию или их комбинацию. В дополнительном аспекте указанная tandemная масс-спектрометрия включает автоматическую регулировку усиления.

[54] В одном аспекте указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии. В конкретном аспекте, указанная система жидкостной хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматография со смешанным режимом или их комбинацию.

[55] В одном аспекте указанные по меньшей мере два параметра выбирают из группы, включающей изоляционное окно m/z , время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС² и любую их комбинацию.

[56] В одном аспекте способ дополнительно включает ферментативное расщепление указанного полипептида перед анализом с помощью tandemной масс-спектрометрии. В конкретном аспекте указанное ферментативное расщепление включает контактирование указанного полипептида с IdeS. В другом аспекте способ дополнительно включает восстановление указанного полипептида перед анализом с помощью tandemной масс-спектрометрии.

[57] В одном аспекте способ дополнительно включает независимое выполнение указанного способа два или более раз и объединение идентифицированных фрагментов из каждого анализа tandemной масс-спектрометрии для определения аминокислотной последовательности указанного полипептида.

[58] В данном изобретении предложен дополнительный способ определения аминокислотной последовательности антитела. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ включает (а) выбор по меньшей мере двух параметров для ДПЭ-МС², которые влияют на охват последовательности для каждой субъединицы антитела, при этом указанные субъединицы включают Fd, Fc/2 и LC; (b) использование D-оптимальной модели экспериментов для определения значения каждого из указанных по меньшей мере двух параметров для каждой из указанных субъединиц, при этом указанное значение выбирают на основе максимального охвата последовательностей указанной субъединицы; (c) контактирование указанного антитела с IdeS и восстанавливающим агентом для получения указанных субъединиц; (d) подвергание каждой из указанных субъединиц анализу ДПЭ-МС² с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для идентификации аминокислотных последовательностей фрагментов каждой из

указанных субъединиц; (е) независимое повторение этапа (d) по меньшей мере еще один раз для идентификации аминокислотных последовательностей дополнительных фрагментов каждой из указанных субъединиц; и (f) объединение указанных аминокислотных последовательностей указанных фрагментов из этапов (d) и (е) для определения аминокислотной последовательности указанного антитела.

[59] В данном изобретении предложен другой способ определения аминокислотной последовательности антитела. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ включает (а) выбор по меньшей мере двух параметров для ДПЭ-МС², которые влияют на количество низкомолекулярных, среднемолекулярных и высокомолекулярных фрагментов субъединицы антитела, при этом указанные субъединицы включают Fd, Fc/2 и LC, указанные низкомолекулярные фрагменты включают фрагменты размером менее около 5000 Да, указанные среднемолекулярные фрагменты включают фрагменты размером от около 5000 Да до около 10000 Да, и указанные высокомолекулярные фрагменты включают фрагменты размером более 10000 Да; (b) использование D-оптимальной модели экспериментов для определения значения каждого из указанных по меньшей мере двух параметров для каждого из указанных размеров фрагментов для каждой из указанных субъединиц, при этом указанное значение выбирают на основе получения наибольшего количества фрагментов указанных размеров для указанной субъединицы; (с) контактирование указанного антитела с IdeS и восстанавливающим агентом для получения указанных субъединиц; (d) подвергание каждой из указанных субъединиц анализу ДПЭ-МС² с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для каждого из указанных размеров фрагментов для идентификации аминокислотных последовательностей фрагментов каждой из указанных субъединиц; (е) независимое повторение этапа (d) по меньшей мере еще один раз для идентификации аминокислотных последовательностей дополнительных фрагментов каждой из указанных субъединиц; и (f) объединение указанных аминокислотных последовательностей указанных фрагментов из этапов (d) и (е) для определения аминокислотной последовательности указанного антитела.

[60] Эти и другие аспекты данного изобретения можно будет лучше оценить и понять при рассмотрении в сочетании с приведенным далее описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты реализации и их многочисленные конкретные детали, приведено в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перестройки могут быть выполнены в рамках объема данного изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[61] Сопроводительные графические материалы, которые включены в данную спецификацию и являются ее частью, иллюстрируют несколько вариантов реализации данного изобретения и вместе с описанием служат для объяснения принципов описания данного изобретения.

[62] На Фиг. 1А представлена схема анализа по данному изобретению, состоящего из четырех (4) указанных этапов. Этап 1 демонстрирует этап расщепления, опосредованного ферментом IdeS, так что в результате образуются три (3) полипептида по 25 килодальтон (кДа), и они представляют собой Fd (вариабельную область тяжелой цепи антитела), Fc/2 (Fc-фрагмент константной области антитела) и LC (вариабельную область легкой цепи антитела), как указано на схеме. Этап 2 демонстрирует иллюстративное моделирование DOE для оптимального использования ДПЭ для охвата последовательностей вышеупомянутых фрагментов антител. Этап 3 демонстрирует иллюстративное применение трех различных настроек, которые могут быть применены в пределах диапазона DOE. Этап 4 демонстрирует иллюстративный результат улучшенного охвата последовательности (ОП) субъединицы антитела, при этом большинство остатков последовательности точно идентифицировано.

[63] На Фиг. 2А представлено сравнение прогнозируемого и фактического охвата последовательностей Fc/2, LC и Fd субъединиц антитела с использованием способа по данному изобретению согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения. Только G1F был включен в определение охвата последовательностей субъединицы Fc/2.

[64] На Фиг. 2В представлено сравнение прогнозируемого и фактического количества фрагментов из каждой группы низкомолекулярных, среднемолекулярных и высокомолекулярных фрагментов для субъединицы LC антитела с использованием способа по данному изобретению согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

[65] На Фиг. 2С представлено распределение по размерам фрагментов Fc/2, LC и Fd субъединиц антитела с использованием настроек, оптимизированных для получения низкомолекулярных, среднемолекулярных и высокомолекулярных фрагментов, согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

[66] На Фиг. 3А представлен охват последовательностей субъединиц Fc/2, LC и Fd антитела после объединения трех независимых прогонов ДПЭ-фрагментации для каждой субъединицы согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

[67] На Фиг. 3В представлен охват последовательностей субъединиц Fc/2, LC и Fd антитела после объединения нескольких независимых прогонов ДПЭ-фрагментации с

использованием параметров, оптимизированных для получения низкомолекулярных, среднемолекулярных и/или высокомолекулярных фрагментов, согласно иллюстративному варианту реализации данного изобретения.

[68] На Фиг. 4 представлены иллюстративные последовательности легкой и тяжелой цепи терапевтического антитела, пригодного для использования при моделировании и анализах по данному изобретению.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[69] Если не указано иное, все применяемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании, сейчас описаны конкретные способы и материалы.

[70] Термин в единственном числе следует понимать как обозначающий «по меньшей мере один»; и термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартное отклонение, как понятно специалисту в данной области техники; и в тех случаях, когда указаны диапазоны, включены крайние точки диапазонов. Используемые в данном документе термины «включать», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера и понимаются как означающие «содержать», «содержит» и «содержащий» соответственно.

[71] Используемый в данном документе термин «белок» или «белок, представляющий интерес» может включать любой полимер аминокислоты, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или более полимерных цепей аминокислот, широко известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных структурных вариантов, встречающихся в природе, и их синтетических аналогов, не встречающихся в природе, связанных пептидными связями. «Синтетический пептид или полипептид» относится 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 способы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или более полипептидов для образования одной функционирующей биомолекулы. В еще одном иллюстративном аспекте, белок может включать фрагменты антител, нанотела, химеры

рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки, представляющие интерес, могут включать любые биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие химерные слитые белки рецептор-Fc, белки, антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, человеческие антитела и биспецифические антитела. 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). Недавний обзор, посвященный биотерапевтическим белкам и их получению, см. в Ghaderi *et al.*, “Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation” (Darius 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), все идеи которого включены в данный документ посредством ссылки). В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения, 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, FLAG-маркер, мальтоза-связывающий белок (MBP), хитин-связывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), мус-эпитоп, 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 волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

[72] Используемый в данном документе термин «рекомбинантный белок» относится к белку, полученному в результате транскрипции и трансляции гена, переносимого рекомбинантным вектором экспрессии, который был введен в подходящую клетку-хозяина. В определенных типовых вариантах реализации изобретения, рекомбинантный белок может представлять собой антитело, например, химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело. В определенных типовых вариантах реализации изобретения, рекомбинантный белок может представлять собой антитело изотипа, выбранного из группы,

состоящей из: IgG, IgM, IgA1, IgA2, IgD, или IgE. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения, молекула антитела представляет собой полноразмерное антитело (например, IgG1) или в качестве альтернативы антитело может представлять собой фрагмент (например, фрагмент Fc или фрагмент Fab).

[73] Термин «антитело» относится к терапевтическому иммунобиндеру, например, моноклональному антителу, би- или мультиспецифическому антителу, которое подходит для введения субъекту для регуляции заболевания или расстройства, например, иммунного или онкологического расстройства. Термин «антитело» следует толковать в широком смысле как описание моноклональных антител, биспецифических антител, композиций антител с мультиспецифичностью, а также фрагментов или субъединиц антител (например, Fab, F(ab')₂, scFv, Fv, Fd, Fc/2 и LC), производных антител, слияний, вариантов и аналогов.

[74] Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как 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 (обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах реализации данного изобретения FR антитела против big-ET-1 (или его антигенсвязывающий участок) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Используемый в данном документе термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител.

[75] 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 способов, таких как протеолитическое расщепление или технологий рекомбинантной генной инженерии, включающие манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или является легкодоступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и манипулировать с ней химическим путем или с использованием способов молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или делеции аминокислот и т.д.

[76] Используемый в данном документе термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и выделенная область, определяющая комплементарность (CDR), а также триатела, тетраатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения, фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, и который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения, фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сопоставимой с аффинностью исходного антитела, и/или конкурирует с исходным антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела может быть получен любым способом. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем с помощью фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность

антитела. В альтернативном варианте или в качестве дополнения фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела необязательно может содержать фрагмент одноцепочечного антитела. В альтернативном варианте или в качестве дополнения фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, с помощью дисульфидных связей. Фрагмент антитела необязательно может содержать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот, а более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

[77] Используемый в контексте данного документа термин «Fd» относится к субъединице антитела, содержащей переменную область тяжелой цепи антитела, составляющую приблизительно 25 кДа (см. также Фиг. 1). Используемый в контексте данного документа термин «Fc/2» относится к субъединице антитела, содержащей константную область тяжелой цепи антитела, составляющую приблизительно 25 кДа (см. также Фиг. 1). Используемый в контексте данного документа термин «LC» относится к субъединице антитела, содержащей переменную область легкой цепи антитела, составляющую приблизительно 25 кДа (см. также Фиг. 1).

[78] Термин «биспецифическое антитело» включает антитело, способное избирательно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь специфически связывается с другим эпитопом - либо с двумя разными молекулами (например, антигенами), либо с одной и той же молекулой (например, с одним и тем же антигеном). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один, два, три или четыре порядка 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.

[79] Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3, а также легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может связываться с каждой тяжелой цепью, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или более эпитопов, связанных с антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание одного или обоих из тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. БсАт можно разделить на два основных класса: те, которые несут Fc-область (IgG-подобные), и те, у которых отсутствует Fc-область, при этом последние обычно меньше, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные бсАт могут иметь различные форматы, такие как, но не ограничиваясь, триомаб, IgG с выступами во впадинах (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, Ig с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig), Fab «два в одном» или двойного действия (DAF), IgG-одноцепочечные Fv (IgG-scFv) или κλ-тела. Различные отличные от IgG-подобных молекул форматов включают тандемные scFv, формат диатела, одноцепочечное диатело, тандемные диатела (TandAb), молекулу переориентирующегося антитела с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, нанотела или антитела, получаемые с помощью способа «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), полные идеи которого включены в данный документ). Способы получения бсАт не ограничиваются квадромной технологией, основанной на соматическом слиянии двух различных клеточных линий гибридомы, химической конъюгации, включающей химические сшивающие агенты, и генетическими подходами, использующими технологию рекомбинантной ДНК.

[80] Используемый в данном документе термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, характеризующемуся специфичностью связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. Хотя такие молекулы обычно связывают только два антигена (т.е., биспецифические антитела, бсАт), антитела с дополнительными специфичностями, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИТ, также могут быть обработаны с помощью системы и способом, раскрытыми в данном документе.

[81] Используемый в данном документе термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью технологии гибридомы. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой

эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любым доступным или известным в данной области техники способом. Моноклональные антитела, подходящие для целей данного изобретения, могут быть получены с использованием широкого спектра способов, известных в данной области техники, в том числе использование технологий гибридомы, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

[82] Термин «НИСТмАт» относится к стандарту моноклонального антитела «стандарт моноклонального антитела гуманизированного IgG1к Национального института по стандартизации и технологиям (NISTmAb)».

[83] Используемый в контексте данного документа термин «посттрансляционные модификации» или «ПТМ» относится к ковалентным модификациям, которым подвергаются полипептиды, как во время (котрансляционная модификация), так и после (посттрансляционная модификация) их рибосомного синтеза. ПТМ в целом вводят при помощи специфических ферментов или ферментативных путей. Множество их происходит в месте специфической характеристической белковой последовательности (сигнатурная последовательность) в главной цепи белка. Было зарегистрировано несколько сотен ПТМ, и указанные модификации неизменно оказывают влияние на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. "Proteins" (2014) second edition, published by Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваются, расщепление, N-концевые удлинения, деградацию белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование фрагментов лизина биотином), амидирование C-конца, гликозилирование, иодирование, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование (присоединение ацетильной группы, обычно на N-конце белка), алкилирование (присоединение алкильной группы (например, метил, этил, пропил), обычно на остатках лизина или аргинина), метилирование, аденилирование, АДФ-рибозилирование, ковалентные поперечные связи внутри полипептидной цепи или между цепями, сульфонирование, пренилирование, витамин С-зависимые модификации (гидроксилирование пролина и лизина и амидирование карбокси-конца), витамин К-зависимая модификация, при которой витамин К представляет собой кофактор карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты, приводящего к образованию γ -карбоксиглутамата (остаток glu), глутамилирование (ковалентное присоединение остатков глутаминовой кислоты), глицилирование (ковалентное присоединение остатков глицина), гликозилирование (присоединение гликозильной группы к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину, приводящее к образованию гликопротеина), изопренилирование (присоединение изопреноидной группы, такой как

фарнезол и геранилгераниол), липолирование (присоединение функциональной группы липоата), фосфопантетеинилирование (присоединение остатка 4'-фосфопантетеинила из кофермента А, как в биосинтезе жирной кислоты, поликетид, нерибосомного пептида и лейцина), фосфорилирование (присоединение фосфатной группы, обычно к серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфирование (присоединение сульфатной группы, обычно к остатку тирозина). Посттрансляционные модификации, изменяющие химическую природу аминокислот, включают, но не ограничиваются, цитруллинирование (превращение аргинина в цитруллин путем дезиминирования) и дезамидирование (превращение глутамина в глутаминовую кислоту или аспарагина в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, включающие структурные изменения, включают, но не ограничиваются, образование дисульфидных мостиков (ковалентных связей между двумя аминокислотами цистеина) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). В иллюстративном варианте реализации данного изобретения, посттрансляционная модификация представляет собой расщепление лизина на С-конце белка. Некоторые посттрансляционные модификации включают присоединение других белков или пептидов, такие как ISG-илирование (ковалентное присоединение белка ISG15 (ген, стимулированный интерфероном)), SUMO-илирование (ковалентное присоединение белка SUMO (малый убиквитин-подобный модификатор)) и убиквитинирование (ковалентное присоединение белка убиквитина). См. источник информации European Bioinformatics Institute Protein Information Resource SIB Swiss Institute of Bioinformatics, European Bioinformatics Institute Drs - Drosomycin precursor - *Drosophila melanogaster* (Fruit fly) - Drs gene & protein, <http://www.uniprot.org/docs/ptmlist> для более подробного контролируемого перечня ПТМ по рекомендациям UniProt. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ по данному изобретению можно использовать для идентификации, количественной оценки и/или характеристики посттрансляционных модификаций полипептида, например, антитела.

[84] Используемый в контексте данного документа «образец» может быть получен на любом этапе биопроцесса, таком как жидкость для культивирования клеток (CCF), жидкость для культивирования собранных клеток (HCCF), на любом этапе последующей обработки, этапе лекарственного вещества (DS) или лекарственного продукта (DP), содержащих конечную лекарственную форму. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах реализации данного изобретения образец может быть выбран на любом этапе последующего процесса: осветления, хроматографического производства или фильтрации.

[85] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения образец, включающий белок, представляющий интерес, может быть приготовлен перед анализом ЖХ-МС. Этапы подготовки могут включать денатурацию, алкилирование, разбавление, восстановление и расщепление.

[86] Используемый в контексте данного документа термин «агент, алкилирующий белок» или «агент алкилирования» относится к агенту, используемому для алкилирования определенных свободных аминокислотных остатков в белке. Неограничивающими примерами агентов, алкилирующих белок, являются йодацетамид (IOA/IAA), хлорацетамид (CAA), акриламид (AA), N-этилмалеимид (NEM), метилметантиосульфат (MMTS) и 4-винилпиридин или их комбинации.

[87] Используемый в контексте данного документа термин «денатурация белка» или «денатурация» может относиться к процессу, при котором трехмерная форма молекулы изменяется по сравнению с ее нативным состоянием. Денатурацию белка можно проводить с применением агента, денатурирующего белок. Неограничивающие примеры агента, денатурирующего белок, включают нагревание, высокий или низкий уровень pH, восстанавливающие агенты, такие как DTT, или воздействие хаотропных агентов. Несколько хаотропных агентов могут быть использованы в качестве агентов, денатурирующих белки. Хаотропные растворенные вещества повышают энтропию системы посредством препятствования внутримолекулярным взаимодействиям, опосредованным нековалентными силами, такими как водородные связи, ван-дер-ваальсовы силы и гидрофобные эффекты. Неограничивающие примеры хаотропных агентов включают бутанол, этанол, хлорид гуанидиния, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину, N-лауроилсаркозин, мочевины и их соли.

[88] В контексте данного документа термин «расщепление» относится к гидролизу одной или большего количества пептидных связей белка. Существует несколько подходов к проведению расщепления белка в образце с помощью пригодного гидролизующего агента, например, ферментативное расщепление или неферментативное расщепление. Расщепление белка на составляющие его пептиды может привести к получению «белкового лизата», который можно дополнительно проанализировать с помощью анализа картирования пептидов. Термин «белковый лизат» относится к смеси пептидов, полученной в результате воздействия на полипептид, например антитело, как описано в данном документе, во время инкубации с одним или более ферментами (например, IdeS), способными расщеплять белковую

последовательность антитела, так что полипептиды соответствующих размером могут быть исследованы с использованием способов по данному изобретению.

[89] Используемый в контексте данного документа термин «расщепляющий фермент» относится к любому из большого числа различных агентов, которые могут осуществлять расщепление белка. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают протеазу из *Aspergillus Saitoi*, эластазу, субтилизин, протеазу XIII, пепсин, трипсин, трип-N, химотрипсин, аспергиллопепсин I, протеазу LysN (Lys-N), эндопротеиназу LysC (Lys-C), эндопротеиназу Asp-N (Asp-N), эндопротеиназу Arg-C (Arg-C), эндопротеиназу Glu-C (Glu-C) или белок наружной мембраны T (OmpT), иммуноглобулин-деградирующий фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), термолизин, папаин, проназу, протеазу V8 или их биологически активные фрагменты или гомологи или их комбинации. Недавний обзор, в котором обсуждаются доступные способы для расщепления белка, см. в публикации Switazar et al., “Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments” (Linda Switazar, 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)).

[90] В контексте данного документа термин «агент, восстанавливающий белок» относится к агенту, применяемому для восстановления дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающими примерами агентов, восстанавливающий белок, используемых для восстановления белка, являются дитиотреитол (DTT), β -меркаптоэтанол, реактив Элмана, гидрохлорид гидроксилamina, цианоборгидрид натрия, гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCPEP-HCl) или их комбинации. Обычный способ анализа белков, картирование восстановленных пептидов, включает восстановление белков перед анализом ЖХ-МС. Напротив, при картировании невосстановленных пептидов этап восстановления образца не проводится, чтобы сохранить эндогенные дисульфидные связи. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения восстанавливающий агент используется для разделения субъединиц антитела после расщепления с использованием IdeS.

[91] В данном контексте термин «жидкостная хроматография» относится к процессу, в котором биологическая/химическая смесь, переносимая жидкостью, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального разделения компонентов при их протекании насквозь или внутри стационарной жидкости или твердой фазы. Неограничивающие примеры жидкостной хроматографии включают обращенно-фазовую жидкостную хроматографию (ОФ-ЖХ), ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную

хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия или хроматография со смешанным режимом. В некоторых аспектах образец, содержащий по меньшей мере один представляющий интерес белок или белковый лизат, может быть подвергнут любому из вышеупомянутых хроматографических способов или их комбинации. Аналиты, разделенные с помощью хроматографии, будут иметь характерное время удерживания, отражающее скорость, с которой аналит проходит через хроматографическую колонку. Аналиты можно сравнивать с помощью хроматограммы, на которой время удерживания отложено по одной оси, а измеренный сигнал — по другой оси, при этом измеренный сигнал может быть получен, например, при УФ-детектировании или флуоресцентном детектировании.

[92] В контексте данного документа термин «масс-спектрометр» включает устройство, способное идентифицировать конкретные виды молекул и измерять их точные массы. Предполагается, что этот термин включает любой молекулярный детектор, с помощью которого можно охарактеризовать полипептид или пептид. Масс-спектрометр может состоять из трех основных частей: источника ионов, масс-анализатора и детектора. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры определяемого вещества могут переноситься в газовую фазу и могут быть ионизированы одновременно (как при ионизации электрораспылением (ESI)) либо посредством отдельных процессов. Выбор источника ионов зависит от области применения.

[93] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В контексте данного документа термин «tandemная масс-спектрометрия» включает способ, в котором структурную информацию о молекулах образца получают посредством применения множества этапов отбора по массам и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что молекулы образца должны быть переведены в газовую фазу и ионизированы таким образом, чтобы фрагменты образовывались предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массам. MS/MS или MS² можно выполнить, сначала выбрав и выделив ион-предшественник (MS¹) и фрагментировав его для получения значимой информации. Tandemную MS 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. Две основные категории способов tandemной MS представляют собой «tandem в пространстве» и «tandem во времени», но есть также гибридные

способы, в которых анализаторы «тандем во времени» соединены в пространстве или с анализаторами «тандем в пространстве». Масс-спектрометр «тандем в пространстве» включает источник ионов, устройство активации ионов-предшественников и по меньшей мере два не захватывающих масс-анализатора.

[94] Тандемная масс-спектрометрия может давать серии ионов в зависимости от характера фрагментации анализируемого полипептида, например, а- и х-ионы, b- и у-ионы или с- и z-ионы. Используемые в контексте данного документа термины «с-ион» и «z-ион» относятся к преобладающим ионам, наблюдаемым, когда полипептид подвергается аналитическому способу ДПЭ.

[95] Используемый в контексте данного документа термин «полная ионная хроматограмма» или «хроматограмма общего ионного тока» (TIC) относится к представлению данных ЖХ-МС, отображающих общую интенсивность сигнала в зависимости от времени удерживания.

[96] Используемый в контексте данного документа термин «top-down» относится к аналитическому способу, в котором входной образец представляет собой большой или интактный белок/полипептид, например, при анализе интактных масс. Используемый в контексте данного документа термин «bottom-up» относится к аналитическому способу, в котором входной образец представляет собой белок/полипептид, который был уменьшен до малых субъединиц, например, при картировании пептидов. Используемый в контексте данного документа термин «middle-down» относится к аналитическому способу, в котором входной образец представляет собой белок/полипептид, который был уменьшен до субъединиц среднего размера, например, с помощью расщепления антитела с помощью IdeS.

[97] Используемый в контексте данного документа термин « m/z » или «отношение массы к заряду» относится к аналитическому параметру для характеристики аспектов полипептида с использованием, например, ЖХ-МС, ЖХ-МС/МС и/или ДПЭ, при этом m обозначает массу, а z обозначает число зарядов наблюдаемых ионов. Конкретные функции разделения m/z могут быть разработаны таким образом, что в одной секции прибора ионы отбираются, диссоциируются в промежуточной области, а затем ионные продукты передаются в другой анализатор для разделения по m/z и сбора данных. В масс-спектрометре «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.

[98] Пептиды, идентифицированные с помощью масс-спектрометра, могут быть использованы в качестве суррогатных представителей интактного белка, их содержания, их

посттрансляционных модификаций или других модификаций. Их можно применять для характеристики белков посредством сопоставления экспериментальных и теоретических данных МС/МС, при этом последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Указанная характеристика включает, но не ограничивается, секвенирование аминокислот белковых фрагментов, проведение секвенирования белка, проведение секвенирования белка *de novo*, локализацию посттрансляционных модификаций или вариантов последовательности, или определение посттрансляционных модификаций или вариантов последовательности, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

[99] В некоторых иллюстративных аспектах масс-спектрометр может работать с использованием наноэлектрораспыления или нанораспыления. Термин «наноэлектрораспыление» или «нанораспыление», используемый в данном документе, относится к ионизации электрораспылением при очень низкой скорости потока растворителя, обычно сотен нанолитров в минуту раствора образца или ниже, часто без использования внешней подачи растворителя. В настройках нагнетания электрораспыления, создающих наноэлектрораспыление, можно применять статический генератор наноэлектрораспыления или динамический генератор наноэлектрораспыления. Статический генератор наноэлектрораспыления проводит непрерывный анализ небольших объемов раствора образца (анализируемого вещества) в течение длительного времени. В динамическом генераторе наноэлектрораспыления применяют капиллярную колонку и систему подачи растворителя для осуществления хроматографического разделения смесей перед анализом на масс-спектрометре.

[100] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения масс-анализатор может представлять собой квадрупольный масс-анализатор, например тройной квадрупольный масс-спектрометр. Используемый в контексте данного документа термин «РЧ» относится к аналитическому способу характеристики полипептида с использованием радиочастотных (РЧ) квадрупольных столкновений.

[101] Масс-спектрометр может использовать один или более различных способов фрагментации или анализа, включая, например, диссоциацию, индуцированную столкновением (CID), диссоциацию при переносе электрона (ДПЭ), диссоциацию при переносе электрона с индуцированной столкновением диссоциацией (ETciD), диссоциацию при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии (EThcD) или ультрафиолетовую фотодиссоциацию (УФФД).

[102] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения в масс-спектрометрическом анализе может использоваться автоматическая регулировка усиления (APУ). APУ может обеспечивать автоматическую регулировку динамического потока ионов, передаваемого от источника прибора, что приводит к более постоянной популяции ионов в масс-анализаторе для корректировки широкого диапазона относительного содержания ионов в образце. Используемый в контексте данного документа термин «APУ-МС²» относится к тандемному масс-спектрометрическому анализу с автоматической регулировкой усиления.

[103] В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения масс-спектрометрию можно проводить при неденатурирующих условиях. Используемый в контексте данного документа термин «неденатурирующие условия» может включать выполнение масс-спектрометрии в условиях, при которых сохраняются нековалентные взаимодействия в анализируемом веществе. Для подробного обзора нативной МС обратитесь к обзору: Elisabetta Boeri Erba & Carlo Petosa, The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes, 24 PROTEIN SCIENCE 1176–1192 (2015).

[104] Используемый в данном документе термин «база данных» относится к скомпилированному набору белковых последовательностей, которые могут существовать в образце, например, в виде файла в формате FASTA. Соответствующие белковые последовательности могут быть получены из последовательностей кДНК изучаемого вида. Общедоступные базы данных, которые можно использовать для поиска релевантных белковых последовательностей, включают базы данных, организованные, например, Uniprot или Swissprot. Поиск в базах данных может осуществляться с использованием так называемых «инструментов биоинформатики». Инструменты биоинформатики обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров МС/МС по всем возможным последовательностям в базе данных (базах данных) и предоставляют интерпретированные (аннотированные) спектры МС/МС в качестве выходных данных. Неограничивающими примерами таких инструментов являются Mascot (www.matrixscience.com), Spectrum Mill (www.chem.agilent.com), PLGS (www.waters.com), PEAKS (www.bioinformaticssolutions.com), Proteinpilot (download.appliedbiosystems.com/proteinpilot), Phenyx (www.phenyx-ms.com), Sorcerer (www.sagenresearch.com), OMSSA (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/), X!Tandem (www.thegpm.org/TANDEM/), Protein Prospector (prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm), Byonic (www.proteinmetrics.com/products/byonic) или Sequest (fields.scripps.edu/sequest).

[105] Используемый в контексте данного документа термин «DOE» относится к планированию эксперимента, который может быть облегчен с помощью выбранных настроек прибора, многофакторного анализа и/или компьютерного проектирования и программного обеспечения.

[106] Используемый в контексте данного документа термин «D-оптимальная модель» относится к набору параметров DOE, подходящему для секвенирования полипептида с использованием, например, ДПЭ и МС. Параметры могут включать, например, изоляционное окно m/z , время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС². Когда считается важным, параметры, влияющие на спектральное качество ДПЭ и МС², могут быть оптимизированы для достижения полного охвата последовательности полипептидных фрагментов/субъединиц. Параметры могут считаться важными на основании предыдущего опыта пользователя и предыдущей литературы. Процесс включает проектирование с помощью компьютера, при котором подмножество всех соответствующих комбинаций выбирается с целью максимизации D-эффективности модели.

[107] Используемый в контексте данного документа термин «D-эффективность» относится к компьютерному проектированию для снижения рабочей нагрузки и предоставления значимой модели или D-оптимальной модели эксперимента (DOE).

[108] Используемый в контексте данного документа термин «алгоритм THRASH» относится к аналитическому программному обеспечению для выполнения аспектов DOE и D-оптимальной модели.

[109] Если не указано иное, все термины и фразы, используемые в данном документе, включают значения, которые эти термины и фразы приобрели в данной области техники, если иное явно не указано или явно не следует из контекста, в котором используется термин или фраза.

[110] В данном изобретении предложены способы точного выполнения высокоточного секвенирования аминокислотных остатков полипептидов, в частности фрагментов антител (таких как Fd, Fc/2 и LC), с более высокой точностью, чем та, которая была достигнута или о которой сообщалось ранее. Анализы по данному изобретению являются важными инструментами контроля качества для оценки антитела-кандидата, например, в клинических испытаниях или при коммерческом использовании.

[111] Иллюстративный рабочий процесс способа по данному изобретению проиллюстрирован на Фиг. 1, при этом иллюстративные этапы определяются входными параметрами планирования эксперимента (DOE). Данное DOE предоставляет информацию о

применении диссоциации при переносе электрона (ДПЭ) и масс-спектрометрии (МС) для обеспечения более высокого охвата последовательности (ОП) данной субъединицы антитела, чем было достигнуто ранее.

[112] Анализ по данному изобретению с использованием нового набора параметров планирования эксперимента (DOE) может быть откалиброван для обеспечения высокоточных измерений. Данная точность анализа является ключевой для производства сложных белковых молекул, в частности, терапевтических антител, предназначенных для введения субъектам-людям.

[113] Чтобы продемонстрировать эффективность использования подхода DOE к секвенированию антител, этот способ был применен к стандарту гуманизированных моноклональных антител IgG1к Национального института стандартов и технологий (НИСТмАт). С помощью подхода DOE были оптимизированы параметры МС², влияющие на фрагментацию и эффективность ДПЭ, а затем максимально расширен охват последовательностей стандарта моноклональных антител НИСТмАт. Комбинация трех сборов ЖХ-МС² с использованием оптимальных параметров привела к очень высокому охвату последовательностей 71%, 74% и 58% для Fc/2, LC и Fd соответственно. Кроме того, было продемонстрировано, что способность этой стратегии DOE моделировать параметры, необходимые для максимизации количества фрагментов в «низком», «среднем» и «высоком» диапазонах m/z, привела к еще большему охвату последовательностей субъединиц НИСТмАт.

[114] Эта стратегия DOE в конечном итоге привела к еще более высокому охвату последовательностей субъединиц НИСТмАт, составив 80%, 84% и 72% для Fc/2, LC и Fd, соответственно, при объединении шести прогонов. Эти результаты демонстрируют более высокий охват последовательностей при ДПЭ субъединиц моноклональных антител по сравнению со способами, о которых сообщалось ранее. Этот подход был также применен к другим молекулам мАт, и были достигнуты аналогичные результаты, как представлено на Фиг. 3А и Фиг. 3В.

[115] Следует понимать, что в данном изобретении предложено точное определение микроструктуры и точной аминокислотной последовательности терапевтического антитела при сохранении интактных ПТМ. Соответственно, данное изобретение дополняет и улучшает СМС (химические свойства, производство и контроль) любого коммерчески производимого терапевтического антитела (см., например, Фиг. 4).

[116] Например, данное изобретение позволяет усовершенствовать производство и гарантировать равномерность ряда видов терапий антителами. Такая терапия антителами

включает, например, абциксимаб, адалимумаб, адалимумаб-атто, адо-трастузумаб эмтансин, алемтузумаб, алирокумаб, атезолизумаб, авелумаб, базиликсимаб, белимумаб, бевацизумаб, безлтоксумаб, блинатумомаб, брентуксимаб ведотин, бродалумаб, акинумаб, капромаб пендетид, цертолизумаб пегол, цетуксимаб, даклизумаб (Зенапакс), даклизумаб (Зинбрита), даратумумаб, деносумаб, динутуксимаб, дупилумаб, дурвалумаб, экулизумаб, элотузумаб, эволокумаб, голимумаб, ибритумомаб тиуксетан, идаруцизумаб, инфликсимаб, инфликсимаб-абда, инфликсимаб-дийб, ипилимумаб иксекизумаб, меполизумаб, натализумаб, нецитумумаб, ниволумаб, обилтоксаксимаб, обинутузумаб, окрелизумаб, офатумумаб, оларатумаб, омализумаб, паливизумаб, панитумумаб, пембролизумаб, пертузумаб, рамуцирумаб, ранибизумаб, раксибакумаб, резлизумаб, ритуксимаб, секукинумаб, силтуксимаб, тоцилизумаб, тоцилизумаб, трастузумаб, устекинумаб, ведолизумаб, сарилумаб, ритуксимаб и гиалуронидаза, гуселькумаб, инотузумаб озогамин, адалимумаб-adbm, гемтузумаб озогамин, бевацизумаб-awwb, бенрализумаб и эмицизумаб-kxwh. трастузумаб-dkst, инфликсимаб-qbtx, ибализумаб-iiyk, тилдракизумаб-asmn, буросумаб-twza и эренумаб-aooe.

[117] Другие терапевтические антитела, фрагменты антител, слитые белки антител, рецепторы или рецепторные белки, представляющие интерес для различных показаний, являющихся объектом изобретения, включают, например, афлиберцепт (например, для лечения заболеваний глаз); рилонацепт (например, для лечения слепоты и метастатического колоректального рака); алирокумаб (например, для лечения семейной гиперхолестеринемии или клинического атеросклеротического сердечно-сосудистого заболевания (ASCVD)); дупилумаб (например, для лечения атопического дерматита); сарилумаб (например, для лечения ревматоидного артрита и COVID-19); цемиплимаб (например, для лечения заболеваний, связанных с PD-1); и антитела для лечения лихорадки Эбола.

[118] В данном изобретении предложен способ секвенирования полипептида. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ включает воздействие на полипептид лизата таким образом, что получается полипептидная последовательность меньшего размера; выбор D-оптимальных параметров для ДПЭ и МС; подвергание белкового лизата ДПЭ и МС при D-оптимальных параметрах; и определение аминокислотной последовательности полипептида.

[119] В одном аспекте полипептид представляет собой антитело, вариант антитела или слияние антитела.

[120] В одном аспекте расщепление опосредуется ферментом IdeS. В другом аспекте меньший полипептид выбран из группы, включающей Fd, Fc/2 и LC.

[121] В одном аспекте D-оптимальные параметры выбирают для аналитической химии, выбранной из группы, включающей ДПЭ, МС, МС¹, МС², АРУ-МС², ЖХ-МС и ЖХ-МС².

[122] В одном аспекте ДПЭ выбирают из группы, включающей EThcD, ETciD и УФФД.

[123] В одном аспекте МС выбирают из группы, включающей МС¹, МС², АРУ-МС², ЖХ-МС и ЖХ-МС².

[124] В одном аспекте определение аминокислотной последовательности полипептида составляет по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100%.

[125] В данном изобретении предложен дополнительный способ секвенирования полипептида. В некоторых иллюстративных вариантах реализации данного изобретения способ включает воздействие на полипептид лизата таким образом, что получается полипептидная последовательность меньшего размера; выбор D-оптимальных параметров для ДПЭ и ЖХ-МС²; подвергание белкового лизата ДПЭ и ЖХ-МС² при D-оптимальных параметрах; и определение аминокислотной последовательности полипептида.

[126] В одном аспекте полипептид представляет собой антитело, вариант антитела или слияние антитела. В конкретном аспекте антитело или слияние антитела выбирают из группы, включающей афлиберцепт, рилонацепт, алирокумаб, дупилумаб, сарилумаб, цемиплимаб и антитела против лихорадки Эбола.

[127] В данном изобретении также предложен полипептид, секвенированный любым из способов, описанных выше.

[128] В одном аспекте полипептид выбран из группы, включающей антитело, вариант антитела и слияние антител. В другом аспекте полипептид выбран из группы, включающей афлиберцепт, рилонацепт, алирокумаб, дупилумаб, сарилумаб, цемиплимаб и антитела против лихорадки Эбола.

ПРИМЕРЫ

[129] Приведенные ниже примеры приведены в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничивающие данное изобретение, которое определяется прилагаемой формулой изобретения. Все ссылки и патенты, приведенные в данной заявке, включены в данный документ посредством ссылки.

[130] **Материалы и способы.** В данном изобретении, когда его выполняет специалист в данной области техники, могут использоваться традиционные технологии в области фармацевтической химии, иммунологии, молекулярной биологии, клеточной биологии, технологии рекомбинантной ДНК и способов анализа, как описано, например, в Sambrook *et*

al. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 3rd ed. 2001; Ausubel *et al.* “Short Protocols in Molecular Biology”, 5th ed. 1995; “Methods in Enzymology”, Academic Press, Inc.; MacPherson, Hames and Taylor (eds.). “PCR 2: A practical approach”, 1995; Harlow and Lane (eds.) “Antibodies, a Laboratory Manual” 1988; Freshney (ed.) “Culture of Animal Cells”, 4th ed. 2000; “Methods in Molecular Biology” vol. 149 (“The ELISA Guidebook” John Crowther) Humana Press 2001, а также более поздние издания этих работ (*например*, “Molecular Cloning” Michael Green (4th Ed. 2012) и “Culture of Animal Cells” Freshney (7th Ed., 2015), а также актуальные электронные версии.

[131] Способы, пригодные для проведения физико-химического анализа пептидов и белков, в частности, антител и их субъединиц, представлены в описании, а также описаны в следующих ссылках и текущих электронных версиях, таких как “Introduction to Protein Mass Spectrometry” Pradip Kumar Ghosh, 2015, “Analytical Characterization of Biotherapeutics” Jennie R. Lill and Wendy Sandoval, 2017, “Mass Spectrometry of Proteins and Peptides: Methods and Protocols Second Edition (Methods in Molecular Biology)” Mary S. Lipton and Ljiljana Paša-Tolic, 2008, “Protein Therapeutics, Methods and Principles in Medicinal Chemistry” Tristan Vaughan, Jane Osbourn, *et al.*, 2017, “Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research” Alisa G. Woods and Costel C. Darie, 2019; и “Protein Analysis using Mass Spectrometry: Accelerating Protein Biotherapeutics from Lab to Patient” Mike S. Lee and Qin C. Ji, 2017.

[132] Реагенты. Вода для жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС), изопропанол (IPA) и ацетонитрил (ACN) были приобретены у Fisher Chemical (Фэйр-Лоун, Нью-Джерси). Муравьиная кислота (FA), дитиотреитол (DTT), 8М гуанидин-HCl были приобретены у Thermo Scientific (Рокфорд, Иллинойс). Протеаза FabRICATOR (IdeS) была приобретена у Genovis (Кембридж, Массачусетс).

[133] Подготовка образцов. НИСТмАт, коммерчески доступный стандарт гуманизированных моноклональных антител IgG1, был приобретен у MilliporeSigma (Сент-Луис, Миссури). 100 мкг НИСТмАт расщепляли с использованием 10 единиц/мкл протеазы FabRICATOR в течение 30 минут при 37 °С. После расщепления добавляли 100 мкл гуанидин-HCl и 25 мкл 1,0 М DTT, и образец инкубировали при 37°С в течение 45 минут, чтобы восстановить антитела до субъединиц Fd, Fc/2 и LC.

[134] Жидкостная хроматография. Обращенно-фазовую жидкостную хроматографию (ОФ-ЖХ) выполняли на приборе UPLC® класса I, оснащенном менеджером бинарных растворителей (BSM) от Waters Corp. (Милфорд, Массачусетс). Перед МС-анализом все образцы были обессолены с использованием колонки Protein BEH C4 VanGuard™ от Waters Corp. (Милфорд, Массачусетс). После этапа обессоливания фрагменты разделяли с

использованием колонки 1 мм x 150 мм Protein BEH C4 (300 Å, 1,7 мкм) от Waters Corp. Подвижная фаза А (ПФА) представляла собой 0,1% FA в воде, а подвижная фаза В (ПФВ) представляла собой 60% ACN, 39,9% IPA и 0,1% FA.

[135] Для каждого эксперимента на колонку наносили 1 мкг расщепленного и восстановленного антитела. После загрузки образца образцы обессоливали при 5% ПФВ в течение пяти минут. Затем градиент увеличивали до 20% ПФВ в течение двух минут, после чего повышали до 60% ПФВ в течение 28 минут. Скорость потока составляла 100 мкл/мин. После элюирования белка колонка была восстановлена до 5% ПФВ перед следующей инъекцией образца.

[136] Масс-спектрометрия. Прибор класса I был соединен с источником ЭРИ масс-спектрометра Thermo Scientific Fusion Lumos Tribrid, оснащенного источником реагента ДПЭ, расположенным в передней части прибора. Напряжение распыления устанавливали на 3700 В, а температуру трубки для переноса ионов устанавливали на 350°C. Перед планированием экспериментов (DOE) было проведено три эксперимента МС¹, чтобы определить окно элюции и распределение заряда для каждой субъединицы, а также убедиться, что между запусками существует минимальный сдвиг времени удерживания.

[137] Информация из трех экспериментов МС¹ использовалась для создания различных целевых МС² на основе DOE. Для экспериментов МС² разрешение Orbitrap было установлено на 120 000, диапазон масс был установлен на нормальный (350-2000 m/z), а процент РЧ линзы был установлен на 30. Каждое сканирование МС² было составлено из 10 микросканиров. Квадруполь использовался для выделения предшественника, а изоляционное окно было сосредоточено в наиболее интенсивном состоянии заряда на основе первоначальных экспериментов МС¹.

[138] Анализ данных. Статистическое программное обеспечение JMP использовалось для создания различных прогонов DOE на основе выбранных факторов. Для каждого прогона полные ионные хроматограммы (TIC) первоначально оценивали в Xcalibur, чтобы определить диапазоны сканирования для каждой субъединицы. Алгоритм THRASH в ProSight PC 4.0 был затем использован для деконволюции изотопных кластеров в спектрах МС² для каждого диапазона сканирования, определенного из Xcalibur. Параметры THRASH в ПК ProSight были установлены следующим образом: минимальное соотношение сигнал/шум было установлено равным 8, а минимальное значение РЧ (надежность) было установлено на 0,95. Допуск по массе фрагмента при МС² был установлен на 20 част./млн.

[139] После деконволюции результаты ProSight были экспортированы в ProSight Lite, при этом к последовательности субъединиц были добавлены соответствующие посттрансляционные модификации (ПТМ), а общий охват субъединиц был определен на основе фрагментов при МС². Затем результаты охвата последовательностей были экспортированы в статистическое программное обеспечение JMP, где было выполнено моделирование для каждой субъединицы, чтобы определить взаимосвязь между выбранными факторами и измеренными ответами.

[140] Следующие рабочие примеры демонстрируют иллюстративные способы улучшенного определения аминокислотной последовательности полипептидов, в частности, субъединиц антител.

ПРИМЕР 1. Стратегия планирования эксперимента (DOE)

[141] В этом примере описываются критерии планирования эксперимента (DOE) для оптимизации параметров диссоциации при переносе электрона (ДПЭ) для точного секвенирования субъединиц антител.

[142] Во-первых, предыдущие знания и опыт, а также информация из опубликованной литературы использовались для определения факторов ДПЭ-МС² для оценки и установления границ проектного пространства. Установка границ, выходящих за пределы проектного пространства, была исключена как не обеспечивающая значимых взаимосвязей между факторами и откликами. Следует понимать, что параметры, влияющие на соответствующий результат, например охват последовательностей или количество идентифицированных фрагментов заданного размера, могут быть выбраны специалистом в данной области техники.

[143] Выбранные факторы, которые считались релевантными для охвата последовательности при ДПЭ-МС² или количества идентифицированных фрагментов, включали изоляционное окно, время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ и мишень для АРУ-МС². Чтобы определить, существует ли нелинейная зависимость между факторами, каждый фактор оценивался на трех разных уровнях. Изоляционное окно оценивалось при 100, 400 и 700 *m/z*. Время реакции ДПЭ оценивали как 5, 10 и 15 мсек. Мишень для реагента ДПЭ оценивалась как 1,0E5, 5,5E5 и 1,0E6. Мишень для АРУ-МС² оценивалась как 5,0E4, 5,3E5 и 1,0E6.

[144] Один из возможных подходов для оценки взаимосвязей между факторами, влияющими на спектры ДПЭ-МС², заключается в использовании полного факторного DOE. Однако при выбранном количестве факторов и уровней полный факторный DOE потребует 81 прогон, что требует значительных ресурсов с точки зрения времени выполнения и анализа

данных. Вместо этого был выбран более эффективный подход с использованием D-оптимального DOE, для которого требовалось всего 28 прогонов ОФ-ЖХ-МС, чтобы максимизировать параметр D-эффективности DOE.

[145] Соответственно, этот пример представляет аспекты изобретения, которые иллюстрируют значение оптимизации параметров DOE для простоты использования при секвенировании полипептида при сохранении точности и охвата последовательности.

ПРИМЕР 2. Оптимальные условия на основе предсказательных моделей для создания максимального охвата последовательностей

[146] В этом примере описаны иллюстративные оптимальные условия анализа для получения максимального охвата аминокислотных остатков субъединицы антитела.

[147] Первая цель состояла в том, чтобы найти оптимальный набор условий с использованием DOE, который максимизировал бы охват последовательности при ДПЭ «middle-down» за один прогон. Для оптимизации ДПЭ были выбраны изоляционное окно для оценки, время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС².

[148] Изоляционное окно, которое контролирует диапазон m/z ионов, направляемых в линейную ионную ловушку при ДПЭ-МС², было сосредоточено в наиболее интенсивном состоянии заряда, наблюдаемом в спектрах МС¹ для каждой субъединицы.

[149] Время реакции диссоциации при переносе электрона относится к количеству времени, в течение которого анионы флуорантена реагируют с ионами-предшественниками, а мишень для реагента ДПЭ относится к количеству анионов флуорантена, которые вводят в линейную ионную ловушку и которым дают возможность реагировать с ионами-предшественниками.

[150] Наблюдения показали, что упомянутые параметры непосредственно отвечают за качество спектров ДПЭ-МС² и, следовательно, будут влиять на охват последовательности при МС². Первоначально статистическое программное обеспечение JMP использовалось для определения подмножества из всех возможных комбинаций выбранных параметров.

[151] Чтобы максимизировать D-эффективность этих моделей, было собрано в общей сложности 28 прогонов для каждого выполненного DOE, а параметры, влияющие на спектры ДПЭ-МС² каждой субъединицы, были смоделированы отдельно, чтобы определить оптимальные настройки параметров, которые обеспечат максимальный охват последовательности.

[152] После обработки данных с помощью алгоритма THRASH в ProSight PC результаты были экспортированы в ProSight Lite, где были зарегистрированы посттрансляционные

модификации, такие как N-связанное гликозилирование субъединицы Fc/2 и превращение N-концевого глутамина в пироглутаминовую кислоту субъединицы Fd. Для Fc/2, поскольку G1F является наиболее распространенной гликоформой НИСТмАт, в расчет охвата последовательностей были включены только виды G1F. Для Fd была рассмотрена последовательность с пироглутаминовой кислотой, поскольку большая часть глутамина быстро превращается в пироглутаминовую кислоту и, следовательно, может считаться основным видом.

[153] На основании результатов DOE было обнаружено, что оптимальные параметры Fc/2 составляют 539,8 m/z , 15 мсек., 9,2E5 и 9,5E5 для ширины выделения, времени реакции ДПЭ, мишени для реагента ДПЭ и мишени для АРУ-МС² соответственно. Модель для Fc/2 демонстрирует сильную корреляцию между охватом последовательностей согласно предсказательной модели и наблюдаемым фактическим охватом последовательностей, как представлено на Фиг. 2А, панель А. Средний охват последовательности при «middle-down» для трех прогонов с использованием оптимальных параметров ДПЭ составил 61,0% для субъединицы Fc/2.

[154] Модели DOE продемонстрировали, что 397,1 m/z , 15 мсек., 9,3E5 и 1E6 для ширины выделения, времени реакции ДПЭ, мишени для реагента ДПЭ и мишени для АРУ-МС², соответственно, были оптимальными рабочими параметрами для достижения максимального охвата последовательностей легкой цепи НИСТмАт (LC), как представлено на Фиг. 2А, панель В. При усреднении трех прогонов с использованием параметров оптимальной фрагментации ДПЭ было обнаружено, что было достигнуто 62,0% охвата последовательности легкой цепи.

[155] Наконец, для субъединицы Fd ширина выделения 503,6 m/z , время реакции ДПЭ 15 мсек, мишень для реагента ДПЭ 7,9E5 и мишень для АРУ-МС² 8,0E5 были определены как оптимальные рабочие параметры для максимального охвата последовательности с использованием ДПЭ, как представлено на Фиг. 2А, панель С.

[156] После определения оптимальных параметров для максимального охвата последовательности из моделей DOE был проведен эксперимент в трех повторах с использованием параметров, чтобы определить, как значения, предсказанные моделью, сопоставляются с фактическими значениями. Фактические экспериментальные значения демонстрирует сильную корреляцию со значениями, предсказанными моделью, с минимальной наблюдаемой процентной ошибкой, как представлено на Фиг. 2А.

[157] Соответственно, этот пример демонстрирует, что стратегия DOE по данному изобретению привела к получению оптимальных настроек параметров для максимального охвата аминокислотной последовательности полипептида, например, субъединицы антитела, которые хорошо соответствовали фактическому охвату последовательности.

ПРИМЕР 3. Объединенный охват последовательностей из нескольких прогонов ЖХ-МС

[158] В этом примере описаны иллюстративные условия анализа для создания максимального охвата последовательности аминокислотных остатков полипептида, например, фрагмента антитела.

[159] Было продемонстрировано, что объединение прогонов фрагментации ДПЭ из нескольких прогонов МС² может дополнительно увеличить охват последовательностей субъединиц моноклональных антител (Fornelli *et al.* 2018; Fornelli *et al.* 2012). После определения оптимальных параметров ДПЭ для максимального охвата последовательностей с использованием стратегии DOE по данному изобретению идентифицированные фрагменты из трех независимых прогонов ДПЭ ОФ-ЖХ-МС² объединяли для определения объединенного охвата последовательностей каждой субъединицы. Этот подход привел к увеличению охвата последовательностей субъединиц Fc/2, LC и Fd на 10-12%, как представлено на Фиг. 3А.

[160] Соответственно, этот пример демонстрирует, что способ по данному изобретению можно использовать для дальнейшего улучшения охвата последовательностей антител путем объединения идентифицированных фрагментов из независимых экспериментов ДПЭ ЖХ-МС.

Пример 4. Получение максимального количества фрагментов низкой, средней и высокой массы для улучшения охвата последовательности субъединицы антитела

[161] Этот пример демонстрирует новый способ разработки условий анализа для создания максимального охвата последовательности аминокислотных остатков полипептида, например, субъединицы антитела.

[162] Первоначальные результаты DOE продемонстрировали, что большинство с- и z-ионов, продуцируемых при оптимизированных параметрах ДПЭ, имели тенденцию концентрироваться ближе к N- и C-концам каждой субъединицы мАт. На основании этих результатов был разработан новый подход для максимального охвата последовательностей каждой субъединицы путем создания моделей DOE, которые определяют параметры ДПЭ-МС², способные генерировать фрагменты разного размера, например низко-, средне- и

высокомолекулярные фрагменты. Для этих экспериментов низкомолекулярные фрагменты определялись как фрагменты менее 5000 Да, среднемолекулярные фрагменты определялись как фрагменты между 5000 и 10000 Да, и высокомолекулярные фрагменты определялись как фрагменты размером более 10000 Да. Объединение результатов прогонов ОФ-ЖХ-МС², полученных с использованием условий для низко-, средне- и высокомолекулярных фрагментов, потенциально может увеличить охват последовательностей, а также разнообразие размеров фрагментов. Этот подход генерировал прогностические модели DOE, измеряющие количество фрагментов ДПЭ-МС², сгенерированных для каждой области масс. На основании результатов DOE были определены параметры ДПЭ, которые генерировали наибольшее количество низко-, средне- и высокомолекулярных фрагментов для трех субъединиц. На Фиг. 2В представлены модели DOE для низко-, средне- и высокомолекулярных фрагментов, демонстрирующие сильную корреляцию между фактическим и прогнозируемым моделью количеством фрагментов, а также высокую значимость модели. Кроме того, среднее количество фрагментов, наблюдаемое экспериментально при использовании оптимальных параметров ДПЭ-МС² для каждой категории размера фрагмента, было сравнимо с прогнозируемым для каждой модели.

[163] Изучение необработанных спектров МС², полученных с использованием моделей DOE, выявило значимые различия между спектральными профилями. Для Fc/2, LC и Fd массовое распределение фрагментов смещалось в зависимости от используемых параметров ДПЭ-МС², как представлено на Фиг. 2С. В случае Fc/2 наблюдалось увеличение нижнего и верхнего квартилей, а также медианы массы фрагмента в условиях низкой, средней и высокой массы. Аналогичная, но менее выраженная тенденция наблюдалась для Fd даже с ранее задокументированными трудностями в достижении высокого охвата последовательности Fd с помощью ДПЭ. Для субъединицы LC наблюдалась значимая разница в нижнем и верхнем квартилях, а также в средней массе фрагмента между группами низко- и среднемолекулярных фрагментов, но лишь небольшая разница наблюдалась между группами средне- и высокомолекулярных фрагментов. Несмотря на это, параметры ДПЭ-МС² для высокомолекулярных фрагментов предоставили дополнительные фрагменты с большой массой и дополнительно увеличили информацию об охвате последовательности субъединицы LC.

[164] Этот пример демонстрирует, что улучшенный охват последовательностей может быть получен с использованием нового способа оптимизации DOE для получения фрагментов

полипептида разного размера с использованием ДПЭ-МС², например, фрагментов с низкой, средней и высокой массой.

Пример 5. Объединенный охват последовательностей в условиях для низко-, средне- и высокомолекулярных фрагментов

[165] Сдвиг медианной массы фрагмента, наблюдаемый для субъединиц Fc/2, LC и Fd в условиях низкой, средней и высокой массы, как представлено на Фиг. 2С демонстрирует, что эти различные условия генерировали значительно отличающиеся ионные популяции, которые при объединении могут предоставить увеличенную информацию об охвате последовательностей субъединиц мАт. Таким образом, способ по данному изобретению был дополнительно оптимизирован путем объединения результатов фрагментации из прогонов ДПЭ Об-ЖХ-МС² для фрагментов с низкой, средней и большой массой для оценки общего увеличения охвата последовательностей для каждой субъединицы.

[166] Два прогона низкомолекулярной, два прогона средномолекулярной и два прогона высокомолекулярной ОФ-ЖХ-МС² были объединены в общей сложности шесть независимых прогонов с использованием параметров ДПЭ, определенных из DOE по массе фрагмента, как описано ранее. Каждое последующее добавление данных о фрагментации из двух прогонов ОФ-ЖХ-МС² дополнительно увеличивало охват последовательностей каждой субъединицы. Этот подход привел к улучшенному охвату последовательностей для Fc/2, LC и Fd, как представлено на Фиг. 3В. Добавление фрагментов из негликозилированного Fc/2, а также всех распространенных гликоформ дополнительно увеличило охват последовательности для Fc/2. Эти результаты охвата последовательностей, полученные только с помощью ДПЭ, значимо отличаются от предыдущего отчета с использованием нескольких прогонов ОФ-ЖХ-МС² и шести различных времен реакции ДПЭ. Объединение данных о фрагментации из более чем шести прогонов ОФ-ЖХ-МС² привело к небольшому увеличению охвата последовательностей или отсутствию увеличения охвата за счет времени анализа прибора и данных.

[167] Был разработан комплексный рабочий процесс для оптимизации рабочих параметров для прибора, обеспечивающего ДПЭ-МС², для максимального охвата последовательностей субъединиц моноклональных антител. Два различных подхода были использованы для максимального охвата последовательностей. Первый способ определял оптимальные параметры ДПЭ-МС² с помощью DOE-моделей для максимального охвата последовательностей. Второй способ улучшил охват последовательностей за счет определения условий ДПЭ, при которых образуются фрагменты с низкой, средней и высокой массой.

Использование этого способа и объединение охвата последовательностей субъединиц Fc/2, LC и Fd давало улучшенный охват последовательностей для всего мАт.

[168] Описанные в данном документе подходы DOE можно использовать для создания прогностических моделей, которые увеличивают охват последовательностей при «middle-down» МС для мАт на разных платформах масс-спектрометров, не требуя дополнительных способов фрагментации. Этот подход может быть распространен на другие способы фрагментации, включая EThcD, ETciD и УФФД, для дальнейшего улучшения охвата аминокислотной последовательности и достижения еще более близкого к полному охвату последовательности моноклонального антитела или другого полипептида.

[169] Хотя в приведенном выше описании данное изобретение было описано в отношении некоторых его вариантов реализации, и многие детали были представлены с целью иллюстрации, специалистам в данной области техники будет очевидно, что данное изобретение допускает дополнительные варианты реализации и что некоторые детали, описанные в данном документе, могут быть изменены без отклонения от основных принципов данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ улучшения охвата последовательностей полипептида, включающий:
 - (a) выбор по меньшей мере двух параметров для тандемной масс-спектрометрии, которые влияют на охват последовательности; и
 - (b) использование D-оптимальной модели экспериментов для определения значения каждого из указанных по меньшей мере двух параметров, при этом указанное значение выбирают на основе максимального охвата последовательностей.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный полипептид представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, фрагмент антитела, субъединицу антитела, белок клетки-хозяина, фармацевтический белковый продукт или их расщепленный фрагмент.
3. Способ по п. 1, дополнительно включающий выполнение способа последовательно или параллельно для двух или более субъединиц полипептида.
4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что указанные субъединицы выбраны из группы, включающей субъединицу Fc/2, Fd или LC антитела.
5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная тандемная масс-спектрометрия представляет собой «middle-down» масс-спектрометрию.
6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр на основе Орбитрэпа.
7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная тандемная масс-спектрометрия включает диссоциацию при переносе электрона, диссоциацию, индуцированную столкновением, диссоциацию при переносе электрона с индуцированным столкновением, диссоциацию при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии, ультрафиолетовую фотодиссоциацию или их комбинацию.
8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная тандемная масс-спектрометрия включает автоматическую регулировку усиления.
9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанная система жидкостной хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию,

эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматография со смешанным режимом или их комбинацию.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные по меньшей мере два параметра выбирают из группы, включающей изоляционное окно m/z , время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС² и любую их комбинацию.

12. Способ определения аминокислотной последовательности полипептида, включающий:

(а) определение значения по меньшей мере двух параметров для tandemной масс-спектрометрии полипептида с использованием D-оптимальной модели экспериментов, при этом указанное значение выбирают на основе максимального охвата последовательности; и

(б) подвергание указанного полипептида tandemному масс-спектрометрическому анализу с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для определения аминокислотной последовательности указанного полипептида.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный полипептид представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, фрагмент антитела, субъединицу антитела, белок клетки-хозяина, фармацевтический белковый продукт или их расщепленный фрагмент.

14. Способ по п. 12, дополнительно включающий выполнение способа последовательно или параллельно для двух или более субъединиц полипептида.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что указанные субъединицы выбраны из группы, включающей субъединицу Fc/2, Fd или LC антитела.

16. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная tandemная масс-спектрометрия представляет собой «middle-down» масс-спектрометрию.

17. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр на основе Орбитрэпа.

18. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная tandemная масс-спектрометрия включает диссоциацию при переносе электрона, диссоциацию, индуцированную столкновением, диссоциацию при переносе электрона с индуцированным столкновением диссоциацией, диссоциацию при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии, ультрафиолетовую фотодиссоциацию или их комбинацию.

19. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная tandemная масс-спектрометрия включает автоматическую регулировку усиления.
20. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что указанная система жидкостной хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматография со смешанным режимом или их комбинацию.
22. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанные параметры выбирают из группы, включающей изоляционное окно m/z , время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС² и любую их комбинацию.
23. Способ по п. 12, дополнительно включающий ферментативное расщепление указанного полипептида перед анализом с помощью tandemной масс-спектрометрии.
24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что указанное ферментативное расщепление включает контактирование указанного полипептида с IdeS.
25. Способ по п. 12, дополнительно включающий восстановление указанного полипептида перед анализом с помощью tandemной масс-спектрометрии.
26. Способ по п. 12, дополнительно включающий независимое выполнение указанного способа два или более раз и объединение идентифицированных фрагментов из каждого анализа tandemной масс-спектрометрии для определения аминокислотной последовательности указанного полипептида.
27. Способ улучшения охвата последовательностей полипептида, включающий:
 - (a) выбор по меньшей мере двух параметров для tandemной масс-спектрометрии, влияющих на количество фрагментов каждого из набора фрагментов разного размера; и
 - (b) использование D-оптимальной модели экспериментов для определения значения каждого из указанных по меньшей мере двух параметров, при этом указанное значение выбирают на основе получения наибольшего количества фрагментов для каждого из указанных выбранных размеров фрагментов.
28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанный полипептид представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, фрагмент антитела, субъединицу антитела, белок клетки-хозяина, фармацевтический белковый продукт или их расщепленный фрагмент.

29. Способ по п. 27, дополнительно включающий выполнение способа последовательно или параллельно для двух или более субъединиц полипептида.
30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что указанные субъединицы выбраны из группы, включающей субъединицу Fc/2, Fd или LC антитела.
31. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанная tandemная масс-спектрометрия представляет собой «middle-down» масс-спектрометрию.
32. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометр на основе Орбитрэпа.
33. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанная tandemная масс-спектрометрия включает диссоциацию при переносе электрона, диссоциацию, индуцированную столкновением, диссоциацию при переносе электрона с индуцированной столкновением диссоциацией, диссоциацию при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии, ультрафиолетовую фотодиссоциацию или их комбинацию.
34. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанная tandemная масс-спектрометрия включает автоматическую регулировку усиления.
35. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.
36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что указанная система жидкостной хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматография со смешанным режимом или их комбинацию.
37. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанные по меньшей мере два параметра выбирают из группы, включающей изоляционное окно m/z , время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС² и любую их комбинацию.
38. Способ по п. 27, отличающийся тем, что указанные размеры фрагментов выбирают из группы, содержащей фрагменты размером менее около 5000 Да, фрагменты размером от около 5000 Да до около 10000 Да и фрагменты размером более около 10000 Да.
39. Способ определения аминокислотной последовательности полипептида, включающий:
- (а) определение значения по меньшей мере двух параметров для tandemной масс-спектрометрии полипептида с использованием D-оптимальной модели экспериментов, при

этом указанное значение выбирают на основе получения наибольшего количества фрагментов для каждого из набора различных размеров фрагментов;

(b) подвергание указанного полипептида анализу с помощью tandemной масс-спектрометрии с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для каждого выбранного размера фрагментов; и

(c) объединение идентифицированных фрагментов из указанного анализа tandemной масс-спектрометрии с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для каждого выбранного размера фрагментов для определения аминокислотной последовательности указанного полипептида.

40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанный полипептид представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, фрагмент антитела, субъединицу антитела, белок клетки-хозяина, фармацевтический белковый продукт или их расщепленный фрагмент.

41. Способ по п. 39, дополнительно включающий выполнение способа последовательно или параллельно для двух или более субъединиц полипептида.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что указанные субъединицы выбраны из группы, включающей субъединицу Fc/2, Fd или LC антитела.

43. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанная tandemная масс-спектрометрия представляет собой «middle-down» масс-спектрометрию.

44. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией нанoeлектрораспылением или масс-спектрометр на основе Орбитрэпа.

45. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанная tandemная масс-спектрометрия включает диссоциацию при переносе электрона, диссоциацию, индуцированную столкновением, диссоциацию при переносе электрона с индуцированной столкновением диссоциацией, диссоциацию при переносе электрона с дополнительной активацией соударениями при повышенной энергии, ультрафиолетовую фотодиссоциацию или их комбинацию.

46. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанная tandemная масс-спектрометрия включает автоматическую регулировку усиления.

47. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что указанная система жидкостной хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматография со смешанным режимом или их комбинацию.

49. Способ по п. 39, отличающийся тем, что указанные по меньшей мере два параметра выбирают из группы, включающей изоляционное окно m/z , время реакции ДПЭ, мишень для реагента ДПЭ, мишень для АРУ-МС² и любую их комбинацию.

50. Способ по п. 39, дополнительно включающий ферментативное расщепление указанного полипептида перед анализом с помощью тандемной масс-спектрометрии.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что указанное ферментативное расщепление включает контактирование указанного полипептида с IdeS.

52. Способ по п. 39, дополнительно включающий восстановление указанного полипептида перед анализом с помощью тандемной масс-спектрометрии.

53. Способ по п. 39, дополнительно включающий независимое выполнение указанного способа два или более раз и объединение идентифицированных фрагментов из каждого анализа тандемной масс-спектрометрии для определения аминокислотной последовательности указанного полипептида.

54. Способ определения аминокислотной последовательности антитела, включающий:

(a) выбор по меньшей мере двух параметров для ДПЭ-МС², влияющих на охват последовательностей для каждой субъединицы антитела, при этом указанные субъединицы включают Fd, Fc/2 и LC;

(b) использование D-оптимальной модели экспериментов для определения значения каждого из указанных по меньшей мере двух параметров для каждой из указанных субъединиц, при этом указанное значение выбирают на основе максимального охвата последовательности указанной субъединицы.

(c) контактирование указанного антитела с IdeS и восстанавливающим агентом для получения указанных субъединиц;

(d) подвергание каждой из указанных субъединиц анализу ДПЭ-МС² с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для идентификации аминокислотных последовательностей фрагментов каждой из указанных субъединиц;

(е) независимое повторение этапа (d) по меньшей мере еще один раз для идентификации аминокислотных последовательностей дополнительных фрагментов каждой из указанных субъединиц; и

(f) объединение указанных аминокислотных последовательностей указанных фрагментов из этапов (d) и (е) для определения аминокислотной последовательности указанного антитела.

55. Способ определения аминокислотной последовательности антитела, включающий:

(a) выбор по меньшей мере двух параметров для ДПЭ-МС², которые влияют на количество низкомолекулярных, среднемолекулярных и высокомолекулярных фрагментов каждой субъединицы антитела, при этом указанные субъединицы включают Fd, Fc/2 и LC, указанные низкомолекулярные фрагменты включают фрагменты размером менее около 5000 Да, указанные среднемолекулярные фрагменты включают фрагменты размером от около 5000 Да до около 10000 Да, и указанные высокомолекулярные фрагменты включают фрагменты размером более 10000 Да;

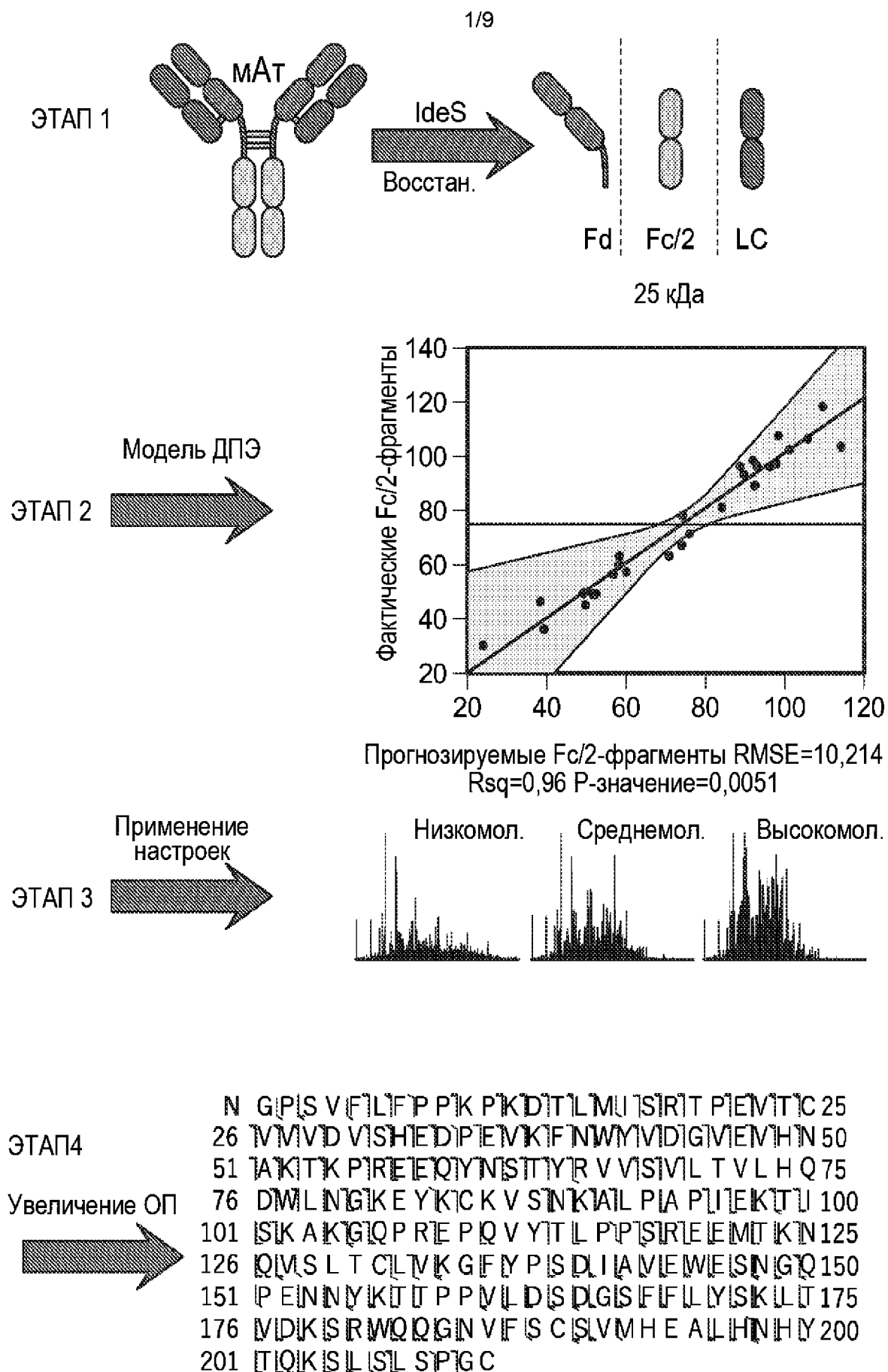
(b) использование D-оптимальной модели экспериментов для определения значения каждого из указанных по меньшей мере двух параметров для каждого из указанных размеров фрагментов для каждой из указанных субъединиц, при этом указанное значение выбирают на основе получения наибольшего количества фрагментов указанных размеров для указанной субъединицы;

(c) контактирование указанного антитела с IdeS и восстанавливающим агентом для получения указанных субъединиц;

(d) подвергание каждой из указанных субъединиц анализу ДПЭ-МС² с использованием указанных значений указанных по меньшей мере двух параметров для каждого из указанных размеров фрагментов для идентификации аминокислотных последовательностей фрагментов каждой из указанных субъединиц;

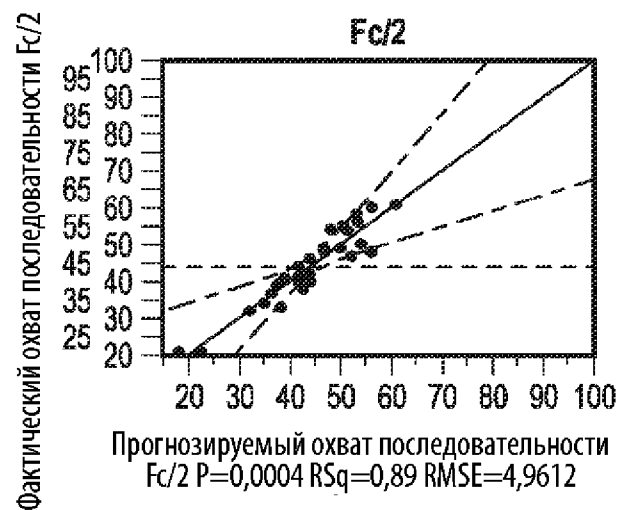
(е) независимое повторение этапа (d) по меньшей мере еще один раз для идентификации аминокислотных последовательностей дополнительных фрагментов каждой из указанных субъединиц; и

(f) объединение указанных аминокислотных последовательностей указанных фрагментов из этапов (d) и (е) для определения аминокислотной последовательности указанного антитела.

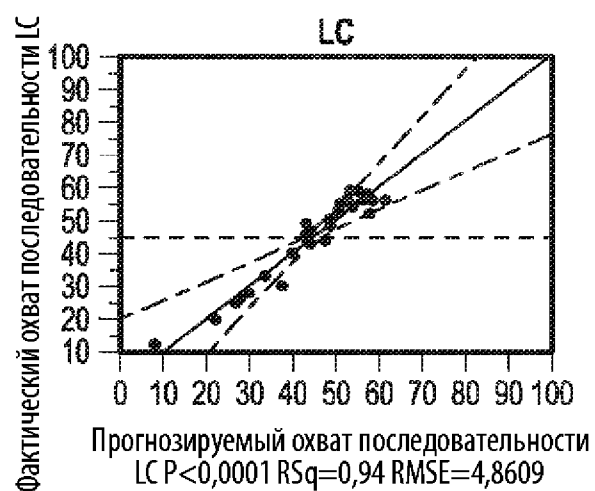


Фиг. 1

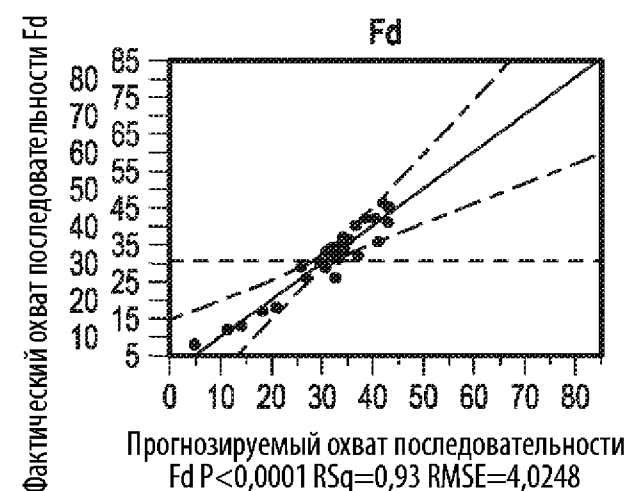
A



B



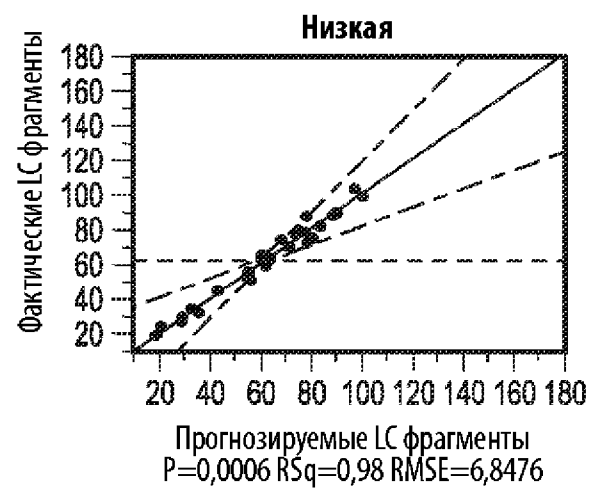
C



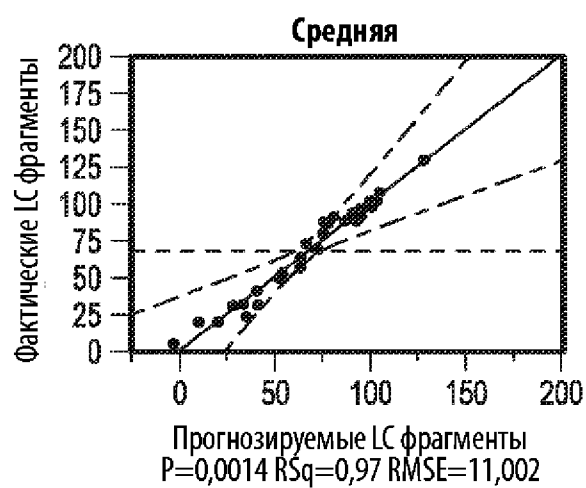
Субъединица	Модельное прогнозируемое значение (%)	Средний охват последовательности (%)	% RSD	% Различия
Fc/2	61,9	61,0	1,6	-1,4
LC	65,3	62,0	4,3	-5,1
Fd	48,2	48,0	1,7	-0,5

Фиг. 2А

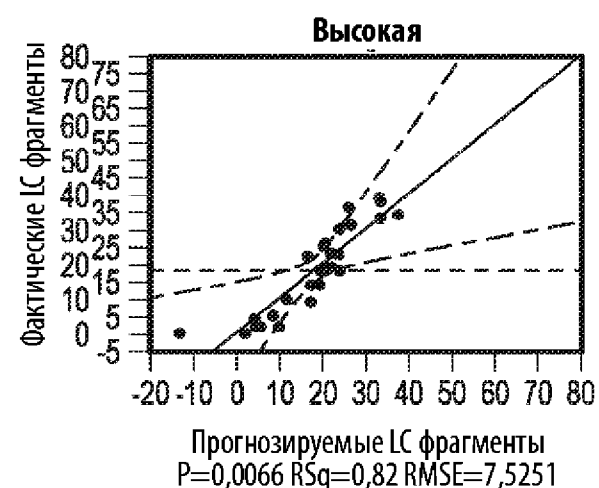
А



В

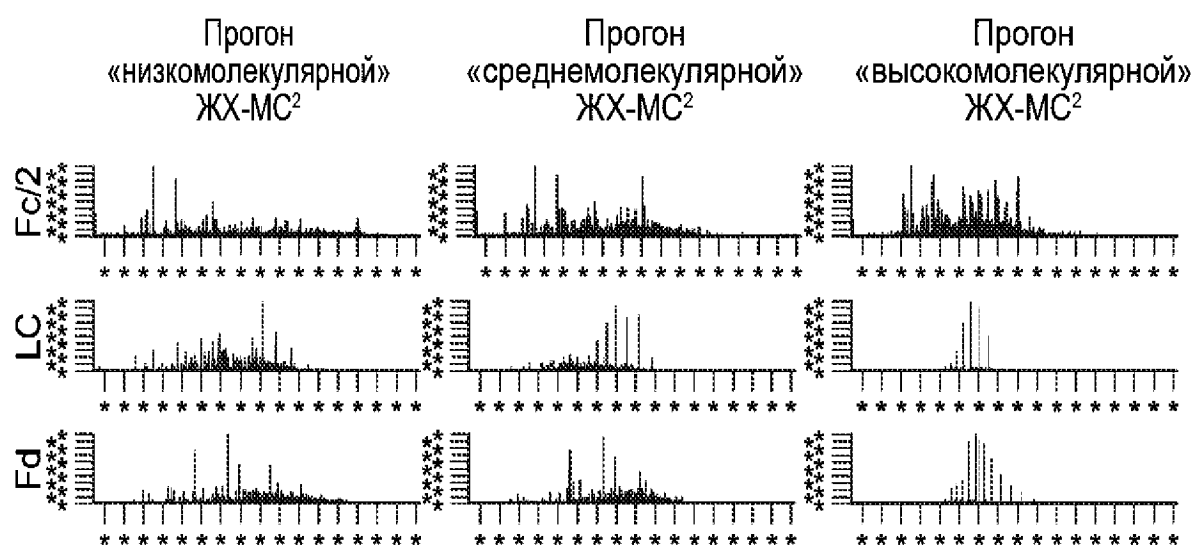


С



Прогон	Модельное прогнозируемое значение	Средний охват последовательности	% RSD	% Различия
Низкая	111	106	7,2	-4,1
Средняя	138	124	7,9	-10,3
Высокая	39	40	2,5	2,3

Фиг. 2В



		Размер фрагментов (Да)		
		«Низко-молекулярные»	«Средне-молекулярные»	«Высоко-молекулярные»
Fc/2	Нижний квартиль	2866	3494	3855
	Медиана	4435	5431	6023
	Верхний квартиль	6718	7599	10252
LC	Нижний квартиль	3640	4500	4484
	Медиана	5729	6931	6931
	Верхний квартиль	7909	9172	9354
Fd	Нижний квартиль	2704	2803	3596
	Медиана	5229	5646	6681
	Верхний квартиль	7610	8267	9693

Фиг. 2С

Fc/2

N G P S V F L F P P K P K D T L M I S R I T P E M T I C 25
 26 M V I D V I S H E D P E M K F N W Y M D G V E M H N 50
 51 A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V I S V L T V L H Q 75
 76 D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I L E K T L I 100
 101 S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E E M T K N 125
 126 Q L V S L T C L V K G F L Y P S D L I A V E L W E L S N G L Q 150
 151 P E L N N Y K T T P P V L L D S D G S F L L L Y S K L L T 175
 176 M D K S R W Q Q G N V F S C L S V M H E A L L H N H Y 200
 201 T L Q K S L L S L S P G C

71%**LC**

N D I Q M T Q S P S T I S A S V G D R V T I T I C S A 25
 26 S S R V G Y M H W Y Q Q K P Q K A P K L L I Y D T 50
 51 S K L A S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S 75
 76 S L Q P D D F I A T Y Y C F Q G S G Y P F T F G G G 100
 101 T K V E L K R T V A A P S V F I F P P S D E I Q L K 125
 126 S L G T A S V M C L L N N F Y P R E I A K V Q W K V D 150
 151 N A L L Q S G N S Q E L S V T L E Q D S K D S T Y L S L L S 175
 176 S L T L T L L S K A D Y L E K H K V L Y A C E V T H L Q G L 200
 201 S L S P L V T K L S F N R G E C C

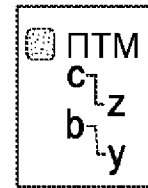
□ ПТМ

$$\begin{matrix} c \\ \searrow \\ z \end{matrix}$$

$$\begin{matrix} b \\ \searrow \\ y \end{matrix}$$
74%**Fd**

N Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T I T Q T F S 25
 26 G F S L S T A G M S V G W I R Q P P G K A L E W L 50
 51 A D I W W D D K K H Y N P S L K D R L T I S K D T 75
 76 S I K N Q V V L K V T N M D P A D T A T Y Y C A R D 100
 101 M I F N F Y F D V W G Q G T T V T V S S A S T K G 125
 126 P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K 150
 151 D Y F P E P L V T V S W N S G A L T S G V H T F P A 175
 176 V L L Q S S G L L Y S L S S V V T V P S S S L L G T Q T 200
 201 Y I Q N V N H K P S N T K V D K R M E P K S C D K 225
 226 T H T C P P Q P A P E L L G C

58%**Фиг. 3А**

2 прогона низкомоп. ЖХ-МС²

N G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C 25
 26 V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N 50
 51 A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q 75
 76 D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T U 100
Fc/2 101 S K A K G L Q P R E P L Q V Y T L P L P S R E E M L T K N 125
 126 L Q V L S L T C L V K G F L Y P L S D L I A V E L W E L S N G L Q 150
 151 L P E L N N L Y K L T T P P L V L L D L S D G L S F L F L L Y L S K L L T 175
 176 L V D L K L S R W L Q L Q L G N V L F L S C L S L V M H E A L L H L N H L Y 200
 201 L T L Q L K L S L L S L S P G C

Охват 66%

N D I Q M T T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C S A 25
 26 S S R V G Y M H W Y Q Q K P G K A P K L L L I Y D T 50
 51 S K L A S G V P S R F S G S G L S G T T E F T L T I S 75
 76 S L L Q P D D F A T Y Y C F Q G S G Y P F T F G G 100
LC 101 T K L V E L I K R L T V A A P S V L F I F P P L S D E L Q L K 125
 126 S G T A S V V C L L N N L F Y P R E L A K L V L Q W K L V D 150
 151 N L A L L Q L S G L N S L Q E L S L V L T L E L Q D L S K D S L T L Y L S L S 175
 176 L S L T L L T L L S K L A D Y L E L K L H L K L V L Y A L C E L V L T H L Q G L 200
 201 L S L P L V L T K L S F L N R G E L C C

Охват 72%

N Q V T L R E S G P A L V K P T T Q T L T L T T C T F S 25
 26 G F S L S T A G M S V G W I R Q P P G K A L E W L 50
 51 A D I W W D D K K H Y N P S L K D R L T I S K D T 75
 76 S K N Q V V L K V T N M D P A D T A T Y Y C A R D 100
Fd 101 L M I F N F Y F D V W G Q G T T V T V L S S A S L T K L G 125
 126 P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K 150
 151 D Y F P E L P V L T V L S W L N S G L A L L T L S L G V H T F P L A 175
 176 L V L L L Q L S L S L G L L Y L S L L S L V L V L T V L P S L S L L L G T Q L T 200
 201 L Y I C L N V L N H L K P L S L N L K L V D L K L R L V L E P L K L S C L D L K 225
 226 L T H T C L P P L C P A L P E L L G C

Охват 54%

Фиг. 3В

2 прогона низкомол. ЖХ-МС² + 2 прогона среднемол. ЖХ-МС²

N G PLS VIFILFIP PJK PKIDITLIM ISTRIT PIVITIC 25
 26 VIVVD VISHIEDIPV KFNWYVDI G VIVHIN 50
 51 AKTK PRIEEQY NLS T YLR V VSVIL T V L H Q 75
 76 D W LNLGK E YLK CK V S NKA L PLA P IELKTLI 100
 101 SLK ALKGLQ P RLE PLQ V Y TLL PLPLSRLELEMLTKLN 125
 126 LQVLS L T CLLVLK GLFLY PSLDLILALVLELWLELSNLGLQ 150
 151 LP ELNINLYKLT T PLPLVLLDLSDLGLSLFLFLLYLSKLLT 175
 176 LVDLKL SRLWLQLQLGN VFLS CLSLVLM H E ALLHLNLHLY 200
 201 LTLQKLSLLSL S P G C

Охват 75%

N D I QIMTQIS P S TILSAS VIG DTR V T I T CISA 25
 26 S SRIVIGYIMHWYQLQK P GKLA PKILLIYVDIT 50
 51 SKIL ASIGVVPISRFISGISGSGITTEFITITILIS 75
 76 SLILQIPDIDIFA T YIY CFIQGSGYIPF TIFG G 100
 101 TIKLVFELI K RLT VJA A PLS VFIIFYPPLSDLELQ LK 125
 126 SIGIT ALS VLVLG L LINTFLY PRLELA KLVQWIKLV D 150
 151 NIAL LQIS GNLSQLFSLVLTLELQDLS KID SITYSLIS 175
 176 S TLL TLLSKIALDYELKHLKLVLYALC ELVLTILQ GU 200
 201 LSLPLVLT KLSFLNR G EIC C

Охват 82%

N QLV T LRIEISGPIALIVK PITQITLITITITIT FLS 25
 26 GIFS L SITIA G M SIVG W I RIQ P PIGKIALIEWL 50
 51 ADIIVWVDI D KIK H YIN PSLIKIDRIITITISKIDIT 75
 76 SIKINQIV VILKIVIT NMD P A D T AIT YIY CAR D 100
 101 IM I F NF YIFD VIVGLQ G T T V T VLSLS ALSIT KLG 125
 126 P S VIFLP LJA P S S K S TLS G GIT A A L G CL V K 150
 151 DLYF P ELP VTLVLS WLN SLGLA LTLGL V LH TIF PLA 175
 176 LVLLQLSLSGLLYLS LLSLVLVLT VLP SLSLSLLG T QIT 200
 201 LY I CIN VLNHLK PSLNLT KLVLDKLRVLELPKLS CLDK 225
 226 LTH T CLP PLC P ALP E L LIG C

Охват 64%

Фиг. 3В (Продолж.)

2 прогона низкомол. ЖХ-МС² + 2 прогона среднемол. ЖХ-МС² +
2 прогона высокомол. ЖХ-МС²

N G PLS VIFLIFIP PJK PKIDITLIM ISTRIT PIEVITIC 25
26 VIVVID VISHIEDIPETVKFNWYVIDGVEVHN 50
51 AKTK PRIELEQYNS TTYLR V VSVIL T V L H Q 75
76 D W LNLGLK E YLKG K V SLNKA LPLALPLLEKLT 100
101 SKAKGLQ P RLE PLQ V Y TLL PLPLSLRLELEMLTKLN 125
126 LQVLS L T CLLVLK GLFY PSLDLIALVLELWLELSNLGLQ 150
151 LP ELNLYKLT T PLPLVLLDLSLDGLSLFLFLLYLSKLLT 175
176 LVLDKLSRLWLQLQLGN VFLS CLSLVLM H E ALLHLNLHLY 200
201 TLQLKLSLLSL S P G C

Охват 78%

N D I QIMTQISIP S TILSIAVS VIGDIR V T I T QISA 25
26 S STRVIGYIMHWYQLQK P GKLA PKLILLIYDIT 50
51 SKIL ASIGLVIPSTRIFSGISGSGITIEFITLITIS 75
76 SLQLQPIDDFAIT YLYCFIQGLSGYIPFITFGLGG 100
101 ITKLVLEIK RIT VIA A PLS VFITFIPPLSDLEIQ LK 125
126 LSGIT ALS VLVCL L LNTNLFY PRLEIAKLVQWKLVD 150
151 NTAALLQIS GNLSQLIEISVLTLEQLDLS KD SLTYSLLS 175
176 SLTLL TL LSKALDYELKHLKLVLYAIC ELVLTILQ GL 200
201 LSLSPVLTKLSFLNR G EIC

Охват 84%

N QLV T LRTEISGIPALIVK PITQITLITLITIT FLS 25
26 GIFS LSTIAG M SIVG W I RIQ P PGKIALEWIL 50
51 ADITWWDID KKH YIN PSLIKDIRLITITIKDIT 75
76 SKINQIV VILKIVLTIN MD P AD T ATTYY C A R D 100
101 M IF NF YIFD VWGLQ G T T V TVLSLS ALSIT KLG 125
126 P S VFLP LLA P SSK S TSG GIT A A L G CLVK 150
151 DLYFLPELP VTLVLS WLN SGLALLTSLG VHLTIF PLA 175
176 LVLLQLSLSGLLYSLLSLSLVVLTVP SLSLSLLG T QIT 200
201 LY I CLNVLNHLK PSLNLTCLKLVLDKLRVLELPKLS CLDK 225
226 LT H T CLP PLC P ALP E LILGC

Охват 71%

Фиг. 3В (Продолж.)

Тяжелая Цепь Дупилумаба

SEQ ID NO: 1

EVQLVESGGG LEQPGGSLRL SCAGSGFTFR DYAMTWVROA PGKGLEWVSS ISSSGGNTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY
LQMNSLRAED TAVYYCAKDR LSITIRPRYY GLDVWGQGT VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE
PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS LGTKYTCNV DHKPSNTKVD KRVEISKYGGP CPPCPAPEFL
GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSQEDPEVQF NQYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTYRVVSV LTVLHQDWLN
GKEYKCKVSN KGLPSSIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSQ EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTT
PVLDSGDSFF LYSRLTVDKS RWQEGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSL GK¹⁵²

Легкая Цепь Дупилумаба

SEQ ID NO: 2

DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL YSIGYNYLDW YLQKSGQSPQ LLIYLGSNRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKT
SRVEAEDVGF YYCMQALQTP YTFGQGTKLE IKRTVAAFSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDHALQ
SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRRGEC²¹⁹

Фиг. 4