

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392550 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.02(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2022.04.08

(54) ИЗМЕРЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, СОВМЕСТНО ВВОДИМЫХ СУБЪЕКТУ, ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ЖХ-ММР-МС

(31) 63/172,567; 63/224,952

(72) Изобретатель:
Чжун Сюэфэй, Мао Юань (US)

(32) 2021.04.08; 2021.07.23

(33) US

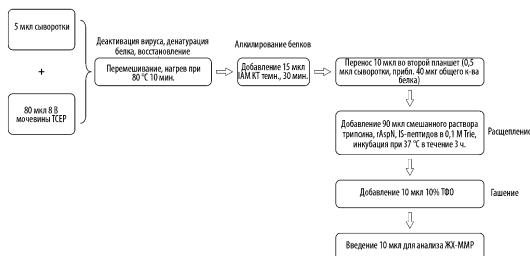
(86) PCT/US2022/023963

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

(87) WO 2022/217020 2022.10.13

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

(57) Настоящее изобретение в целом относится к способам количественного определения терапевтических белков, совместно вводимых субъекту, с использованием ЖХ-ММР-МС. В частности, настоящее изобретение относится к использованию двойного ферментативного расщепления для создания уникальных суррогатных пептидов, обеспечивающих точное количественное определение совместно вводимых терапевтических белков с использованием ЖХ-ММР-МС.



202392550

A1

A1

202392550

ИЗМЕРЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, СОВМЕСТНО ВВОДИМЫХ СУБЪЕКТУ, ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ЖХ-ММР-МС

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает приоритет и преимущество по предварительной заявке на патент США № 63/172,567, поданной 8 апреля 2021 г., и предварительной заявке на патент США № 63/224,952, поданной 23 июля 2021 г., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] Данная заявка относится к способам анализа для количественного определения одного или более терапевтических белков, совместно вводимых субъекту.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Жидкостная хроматография в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) становится предпочтительным способом анализа биофармацевтических препаратов, таких как терапевтические белки. Хотя для этой цели традиционно используют анализы связывания с лигандом (LBA), ЖХ-МС/МС предлагает ряд преимуществ, которые обеспечивают гораздо более быстрый процесс разработки способа. Ключевым аспектом использования ЖХ-МС/МС для анализа терапевтического белка является сквозное количественное определение суррогатного пептида, в качестве уникального идентификатора белка.

[4] Терапевтические белки можно вводить субъекту по отдельности или можно вводить совместно, например, в виде коктейля из антител. В этом случае вмешательство со стороны компонентов матрицы или конкуренция со стороны совместно вводимых терапевтических белков может затруднить идентификацию и количественное определение уникального суррогатного пептида для интересующего терапевтического белка и, следовательно, количественное определение указанного представляющего интерес терапевтического белка или нескольких представляющих интерес терапевтических белков.

[5] Поэтому следует понимать, что существует необходимость в способах точного, быстрого и одновременного количественного определения нескольких совместно вводимых терапевтических белков.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[6] Для определения общих концентраций каждого компонента антитела коктейля из антител в образцах сыворотки был разработан подход, основанный на жидкостной хроматографии — мониторинге множественных реакций — масс-спектрометрии (ЖХ-ММП-МС) в сочетании с двойным ферментативным расщеплением. Рабочие характеристики этого биоаналитического анализа оценивали с точки зрения линейности, точности, прецизионности, селективности, специфичности и стабильности аналита до и после ферментативного расщепления. Разработанный анализ ЖХ-ММП-МС имеет динамический диапазон от около 10 до 2000 мкг/мл лекарственного средства антитела в матрице сыворотки человека, что позволяет охватить концентрацию лекарственного средства в сыворотке от суток 0 до суток 28 после введения лекарственного средства в двух группах дозирования для клинического фармакокинетического исследования. Фармакокинетические профили в двух группах дозирования, измеренные с помощью анализа ММП, были сопоставимы с профилями, измеренными с помощью полностью валидированных электрохемилуминесцентных (ЭХЛ) иммунологических анализов.

[7] В данном изобретении предложен способ одновременного количественного определения по меньшей мере двух совместно вводимых терапевтических белков. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ включает в себя (а) получение образца, содержащего первый терапевтический белок и второй терапевтический белок; (b) создание уникального суррогатного пептида для каждого из указанных первого и второго терапевтических белков путем приведения указанного образца в контакт с по меньшей мере двумя расщепляющими ферментами; (с) количественное определение указанных суррогатных пептидов с использованием масс-спектрометра; и (d) количественное определение указанных первого и второго терапевтических белков с использованием количественно определенных суррогатных пептидов.

[8] В одном аспекте указанные расщепляющие ферменты выбраны из группы, состоящей из трипсина, химо tripsина, LysC, LysN, AspN, GluC и ArgC. В одном конкретном аспекте указанные расщепляющие ферменты содержат трипсин и AspN.

[9] В одном аспекте указанные первый и второй терапевтические белки содержат антитело, моноклональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство или слитый белок. В другом аспекте указанный первый терапевтический белок содержит касиривимаб, а указанный второй терапевтический белок содержит имдевимаб.

[10] В одном аспекте указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или трехквadrupольный масс-спектрометр. В другом аспекте указанный масс-спектрометр соединен с хроматографической системой. В одном конкретном аспекте указанная хроматографическая система включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматографию со смешанным режимом или их комбинацию.

[11] В одном аспекте указанный образец содержит человеческую сыворотку. В другом аспекте указанный способ дополнительно включает в себя отбор указанных расщепляющих ферментов с использованием анализа *in silico* потенциальных суррогатных пептидов. В еще одном аспекте указанное количественное определение суррогатных пептидов включает в себя использование мониторинга множественных реакций. В одном дополнительном аспекте указанный способ дополнительно включает в себя введение субъекту указанных первого и второго терапевтических белков.

[12] В одном аспекте указанный способ имеет динамический диапазон от около 10 до около 2000 мкг/мл первого терапевтического белка в образце. В другом аспекте указанный способ имеет динамический диапазон от около 10 до около 2000 мкг/мл второго терапевтического белка в образце. В еще одном аспекте указанный масс-спектрометр способен осуществлять мониторинг множественных реакций или мониторинг параллельных реакций.

[13] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает в себя этапы проведения пептидного картирования указанных суррогатных пептидов, выбора уникальных пептидов и фрагментных ионов суррогатных пептидов для создания переходов мониторинга множественных реакций, выбора двух или трех верхних переходов суррогатных пептидов, оптимизации энергии соударений суррогатных пептидов, последующее создание калибровочной кривой и определение LLOQ (нижнего предела количественного определения) в соответствии с калибровочной кривой.

[14] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает в себя выбор указанного по меньшей мере одного суррогатного пептида, специфичного к указанному первому или указанному второму терапевтическому белку, причем по меньшей мере один суррогатный пептид предварительно выбран путем определения того, что (i) суррогатный пептид специфичен к гидролизату терапевтического белка, подлежащего количественному определению; (ii) суррогатный пептид конкретно отсутствует в протеазном гидролизате лекарственного средства в отсутствие по меньшей мере одного терапевтического белка; (iii) суррогатный пептид производит сильный сигнал при масс-спектрографическом анализе; и (iv) суррогатный пептид производит различимый сигнал при масс-спектрографическом анализе.

[15] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает в себя денатурирование указанного первого терапевтического белка и указанного второго терапевтического белка до этапа (b). В другом аспекте указанное денатурирование включает в себя приведение указанного первого терапевтического белка и указанного второго терапевтического белка в контакт с денатурирующим раствором. В одном дополнительном аспекте указанный денатурирующий раствор содержит гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР-HCl), мочевины или их комбинацию. В другом конкретном аспекте указанное денатурирование включает в себя нагревание указанного образца до около 80 °C.

[16] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает в себя восстановление указанного первого терапевтического белка и указанного второго терапевтического белка до этапа (b). В другом аспекте указанное восстановление включает в себя приведение указанного первого терапевтического белка и указанного второго терапевтического белка в контакт с восстанавливающим агентом. В одном

дополнительном аспекте указанный восстанавливающий агент представляет собой гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР-HCl).

[17] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает в себя алкилирование указанного первого терапевтического белка и указанного второго терапевтического белка до этапа (b). В другом аспекте указанное алкилирование включает в себя приведение указанного первого терапевтического белка и указанного второго терапевтического белка в контакт с алкилирующим агентом. В одном дополнительном аспекте указанный алкилирующий агент представляет собой йодацетамид.

[18] В данном изобретении также предложен способ одновременного количественного определения касиривимаба и имдевимаба из введенного коктейля из антител. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ включает в себя (a) получение образца сыворотки, содержащего касиривимаб и имдевимаб; (b) создание по меньшей мере одного уникального суррогатного пептида для каждого из касиривимаба и имдевимаба путем приведения указанного образца в контакт с трипсином и AspN; (c) количественное определение указанных суррогатных пептидов с использованием масс-спектрометра; и (d) количественное определение касиривимаба и имдевимаба с использованием количественно определенных суррогатных пептидов.

[19] В одном аспекте указанные суррогатные пептиды содержат аминокислотные последовательности LLIYAASNLETGVPSR и DTAVYYCASGS. В другом аспекте указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или трехквadrupольный масс-спектрометр. В еще одном аспекте указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

[20] В одном аспекте указанный способ дополнительно включает в себя введение субъекту касиривимаба и имдевимаба. В другом аспекте указанный масс-спектрометр способен осуществлять мониторинг множественных реакций или мониторинг параллельных реакций.

[21] Данные и другие аспекты настоящего изобретения будут лучше оценены и поняты при рассмотрении в сочетании со следующим описанием и сопровождающими графическими материалами. Нижеследующее описание, несмотря на указания различных вариантов осуществления изобретения и их многочисленных конкретных деталей,

приводится в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перегруппировки могут быть выполнены без выхода за пределы объема изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[22] На ФИГ. 1 проиллюстрирована последовательность операций для анализа ЖХ-ММР-МС/МС в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

[23] На ФИГ. 2А показан спектр МС/МС индуцированной соударением диссоциации (CID) суррогатного пептида для мАт1, созданного в результате расщепления трипсином и AspN, в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления. На ФИГ. 2В показан спектр CID МС/МС суррогатного пептида для мАт2, созданного в результате расщепления трипсином и AspN, в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления.

[24] На ФИГ. 3 показаны хроматограммы экстрагированных ионов (ХИС) суррогатных пептидов (ФИГ. 3А, ФИГ. 3D), внутренние стандарты (РИС. 3В, ФИГ. 3Е) и графики калибровочной кривой (ФИГ. 3С, ФИГ. 3F) мАт1 (ФИГ. 3А-С) и мАт2 (ФИГ. 3D-Ф), полученные на основании ЖХ-ММР-МС калибровочных стандартов в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления.

[25] На ФИГ. 4А показаны наложенные значения ХИС суррогатного пептида мАт1 из десяти отдельных не подвергшихся воздействию образцов сыворотки человека с добавлением 10 мкг/мл мАт1 и 20 мкг/мл мАт2 в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления. На ФИГ. 4В показаны наложенные значения ХИС суррогатного пептида мАт2 из десяти отдельных не подвергшихся воздействию образцов сыворотки человека с добавлением 10 мкг/мл мАт1 и 20 мкг/мл мАт2 в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления. На ФИГ. 4С показан измеренный процент точности концентраций лекарственного средства в десяти отдельных образцах сыворотки человека с добавлением лекарственных средств на уровне нижнего предела количественного определения (LLOQ) в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления.

[26] На ФИГ. 5А показаны ХИС перехода ММР для суррогатного пептида мАт1 в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления. На ФИГ. 5В показаны

ХИС перехода ММР для суррогатного пептида мАт2 в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления. На ФИГ. 5С показано сравнение процента точности концентраций лекарственного средства мАт1 на пяти уровнях контроля качества (QC), измеренных без присутствия мАт2 в матрице сыворотки или с 2 мг/мл мАт2 на фоне матрицы сыворотки, в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления. На ФИГ. 5D показано сравнение процента точности концентраций лекарственного средства мАт2 на пяти уровнях QC, измеренных без присутствия мАт1 в матрице сыворотки или с 2 мг/мл мАт1 на фоне матрицы сыворотки, в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления.

[27] На ФИГ. 6А показан процент точности измерения стабильности мАт1 в трех различных условиях на пяти уровнях QC в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления. На ФИГ. 6В показан процент точности измерения стабильности мАт2 в трех различных условиях на пяти уровнях QC в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления.

[28] На ФИГ. 7А показан фармакокинетический профиль мАт1, измеренный в образцах сыворотки с помощью анализа ЖХ-ММР-МС и полностью валидированного электрохемиллюминесцентного (ЭХЛ) иммунологического анализа, в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления. На ФИГ. 7В показан фармакокинетический профиль мАт2, измеренный в образцах сыворотки с помощью анализа ЖХ-ММР-МС и полностью валидированного иммунологического анализа ЭХЛ, в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[29] REGEN-COV (касирививмаб и имдевимаб) представляет собой исследуемую терапию с использованием коктейля из антител, разработанную компанией Regeneron Pharmaceuticals, Inc. для лечения коронавирусного заболевания 2019 года (COVID-19), вызванного тяжелым острым респираторным синдромом коронавируса 2 (SARS-CoV-2) (Hansen *et al.*, 2020, *Science*, 369:1010-1014; Baum *et al.*, 2020, *Science*, 370:1110-1115; Weinreich *et al.*, 2021, *N Engl J Med*, 384:238-251). Коктейль из антител содержит два гуманизированных моноклональных антитела IgG1 (называемые в данном документе мАт1 и мАт2), которые предназначены для нацеливания на неперекрывающиеся эпитопы на шиповидном белке SARS-CoV-2, тем самым блокируя взаимодействие вируса SARS-

CoV-2. с ACE2 человека и предотвращая утечку вируса из-за быстрой генетической мутации вируса (Hansen *et al.*; Baum *et al.*, 2020, *Science*, 369:1014-1018). Недавнее клиническое исследование показало, что терапия REGEN-COV может снизить вирусную нагрузку и улучшить симптомы у негоспитализированных пациентов с COVID-19, особенно у тех, кто имел отрицательную серологическую реакцию или имел высокую вирусную нагрузку на исходном уровне (Weinrich *et al.*). На основании многообещающих результатов клинического исследования в ноябре 2020 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) предоставило REGEN-COV разрешение на экстренное использование (EUA) для лечения недавно диагностированного заболевания COVID-19 легкой и средней степени тяжести у взрослых и педиатрических пациентов в возрасте по меньшей мере 12 лет и весом по меньшей мере 40 кг, которые входят в группу высокого риска развития тяжелой формы COVID-19 и/или госпитализации.

[30] Измерение временного профиля концентрации антитела-лекарственного средства в сыворотке после введения лекарственного средства пациентам имеет решающее значение для фармакокинетической (ФК) характеристики терапевтического белка и оптимизации дозы лекарственного средства. Чтобы удовлетворить эту потребность и управлять ускоренной разработкой терапии COVID-19, был разработан и сертифицирован пригодный для использования анализ жидкостной хроматографии — мониторинга множественных реакций — масс-спектропии (ЖХ-ММП-МС) для фармакокинетического исследования REGEN-COV за один месяц, гораздо более короткий период времени, чем тот, который требуется для разработки традиционного анализа связывания с лигандом. В отличие от анализа связывания с лигандом, анализ ЖХ-ММП-МС не требует высокоспецифичных реагентов для захвата и обнаружения аффинности для терапий антителом, разработка и получение которых, как правило, занимает несколько месяцев. Кроме того, анализ ЖХ-ММП-МС по настоящему изобретению также обеспечивает широкий динамический диапазон, хорошую точность и прецизионность, а также превосходную селективность и специфичность для количественного определения белковых биофармацевтических препаратов в матрице сыворотки (van den Broek *et al.*, 2013, *J Chromatogr B*, 929:161-179). В последнее время ЖХ-ММП-МС стала более часто применяемой биоаналитической стратегией как для доклинического, так и для

клинического анализа образцов благодаря постоянному улучшению характеристик приборов ЖХ-МС (Jiang *et al.*, 2013, *Anal Chem*, 85:9859-9867; Zhang *et al.*, 2014, *Anal Chem*, 86:8776-8784; Li *et al.*, 2012, *Anal Chem*, 84:1267-1273; Cardozo *et al.*, 2020, *Nat Commun*, 11:6201; Fernandez Ocana *et al.*, 2012, *Anal Chem*, 84:5959-5967; Shen *et al.*, 2015, *Anal Chem*, 87:8555-8563).

[31] Количественное определение общей концентрации антитела-лекарственного средства, включая свободные и связанные антитела, в образцах сыворотки человека с использованием ЖХ-ММР-МС может быть основано на измерении интенсивностей ионов суррогатных пептидов, полученных из переменных определяющих комплементарность областей (CDR) антител-лекарственных средств (Jenkins *et al.*, 2015, *AAPS J*, 17:1-16). Для обработки образцов сыворотки пациентов, как правило, несколько микролитров образца сыворотки восстанавливали, алкилировали, а затем подвергали протеазному расщеплению. Стабильные меченные тяжелыми изотопами белки или суррогатные пептиды обычно используют в качестве внутренних стандартов (IS) для нормализации изменений сигнала в результате обработки образцов и колебаний характеристик прибора. Чувствительность, селективность и специфичность анализа могут зависеть от уникальных пептидов CDR, выбранных для количественного определения. В случае совместно вводимого коктейля из антител ЖХ-ММР-МС можно легко мультиплексировать для одновременного измерения нескольких аналитов лекарственного средства. Несмотря на ограниченную производительность из-за хроматографического разделения, способ ЖХ-ММР-МС по настоящему изобретению соответствовал требуемому динамическому диапазону, чувствительности, селективности, стабильности и специфичности для раннего измерения концентраций лекарственного средства REGEN-COV в ограниченном количестве образцов сыворотки в клинических испытаниях. Концентрации REGEN-COV в двух группах дозирования амбулаторных пациентов, измеренные с помощью анализа ЖХ-ММР-МС по изобретению, сравнивали с результатами, полученными в результате полностью валидированного иммунологического анализа связывания с лигандом, который продемонстрировал, что оба анализа хорошо согласуются. С данным изобретением приведен пример пригодного применения ЖХ-ММР-МС для анализов клинических образцов, когда возникают проблемы с проведением валидированного иммунологического

анализа в срочном порядке или если не доступны высококачественные реагенты антиидиотипических антител для анализа связывания с лигандом.

[32] Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют значения, являющиеся общепринятыми для рядовых специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение. 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.

[33] Форму единственного числа следует понимать как означающую «по меньшей мере один», а термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают специалисты в данной области техники, и при этом указаны диапазоны, включены конечные точки. В контексте данного документа термины «включать», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера и понимаются как означающие «содержать», «содержит» и «содержащий» соответственно.

[34] В контексте данного документа 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 природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов, связанных пептидными связями, родственных природных структурных вариантов и их синтетических неприродных аналогов. «Синтетические пептиды или полипептиды» относятся к не встречающимся в природе пептидам или полипептидам. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные способы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или более полипептидов для образования одной функционирующей биомолекулы. 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 насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*), системы 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). Белки можно классифицировать на основании 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.

[35] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок, представляющий интерес, может представлять собой рекомбинантный белок, антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок, scFv и их комбинации.

[36] В контексте данного документа 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 иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантный белок может представлять собой антитело, например, химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело. В определенных иллюстративных вариантах осуществления рекомбинантный белок может представлять собой антитело изотипа, выбранного из группы, состоящей из: IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD или IgE. В определенных иллюстративных вариантах осуществления, молекула антитела представляет собой полноразмерное антитело

(например, иммуноглобулин IgG1 или IgG4) или в качестве альтернативы антитело может представлять собой фрагмент (например, фрагмент Fc или фрагмент Fab).

[37] В контексте данного документа 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 к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основании параллельного анализа двух или более CDR. В контексте данного документа термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антител. В контексте данного документа термины «антигенсвязывающий участок» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т.п. включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, включающие проведение манипуляций и экспрессии ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или является легкодоступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и проводить с ней манипуляции химическим

путем или с использованием методов 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.

[38] В контексте данного документа термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, помимо прочего, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, димер dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триател, тетрател, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены с помощью пептидного линкера. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, и который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых иллюстративных вариантах осуществления, 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 любыми средствами. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем посредством фрагментации интактного антитела, и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В альтернативном варианте или в качестве дополнения фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент 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 может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит

по меньшей мере примерно 50 аминокислот, и более типично содержит по меньшей мере примерно 200 аминокислот.

[39] 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), то аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу обычно будет по меньшей мере на один-два, или три, или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или на разных мишенях (например, на одном и том же или на разных белках). Биспецифические антитела можно получить, например, путем объединения тяжелых цепей, распознающих разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

[40] 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. Биспецифические антитела (bsAb) можно разделить на два основных класса: те, которые несут Fc-область (IgG-подобные), и те, у которых отсутствует Fc-область, при этом последние обычно имеют меньший размер, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-

подобные bsAb могут иметь различные форматы, такие как без ограничения триомаб, IgG с выступами во впадинах (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, Ig с двумя переменными доменами (DVD-Ig), Fab «два в одном» или двойного действия (DAF), IgG-одноцепочечные Fv (IgG-scFv) или кл-тела. Различные форматы, не подобные IgG, включают в себя tandemные scFv, формат диател, одноцепочечные диатела, tandemные диатела (TandAb), молекулу перенацеливания с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, нанотела или антитела, продуцируемые способом стыковки и замыкания (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), все идеи которого включены в данный документ).

[41] В контексте данного документа термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, характеризующемуся специфичностью связывания с по меньшей мере двумя различными антигенами. Хотя такие молекулы обычно связывают только два антигена (т. е. биспецифические антитела, bsAb), антитела с дополнительными специфичностями, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИ, также могут быть обработаны с помощью системы и способа, раскрытых в данном документе.

[42] В контексте данного документа 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 настоящего изобретения, могут быть получены с использованием широкого спектра методик, известных в данной области техники, в том числе использование технологий гибридомы, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинации.

[43] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок, представляющий интерес, может быть получен из клеток млекопитающих. Клетки млекопитающих могут иметь человеческое или отличное от человеческого происхождение и могут включать первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, эпителиальные клетки шейки матки, бронхиальные эпителиальные клетки,

эпителиальные клетки трахеи, эпителиальные клетки почек и эпителиальные клетки сетчатки), подтвержденные клеточные линии и их штаммы (например, эмбриональные клетки почки 293, клетки ВНК, клетки эпителия шейки матки HeLa и клетки сетчатки PER-C6, клетки MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки CHO, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Нер-2, клетки KB, клетки LSI80, клетки LS174T, клетки NCI-H-548, клетки RPMI2650, клетки SW-13, клетки T24, клетки WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-1, клетки LLC-MK2, клетки клона М-3, клетки 1-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки LLC-PK1, клетки PK(15), клетки GH1, клетки GH3, клетки L2, клетки LLC-RC 256, клетки MHiCi, клетки XC, клетки MDOK, клетки VSW и TH-1, клетки B1, клетки BSC-1, клетки RAf, клетки RK, клетки PK-15 или их производные), клетки фибробластов из любой ткани или органа (в том числе помимо прочего сердца, печени, почек, толстой кишки, кишечника, пищевода, желудка, нервной ткани (головной мозг, спинной мозг), легких, сосудистой ткани (артерии, вены, капилляры), лимфоидной ткани (лимфатические железы, аденоиды, миндалины, костный мозг и кровь), селезенки, а также фибробласты и фибробластоподобные клеточные линии (например, клетки CHO, клетки TRG-2, клетки IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки, характерные для цитруллинемии, клетки Dempsey, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, клетки HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки Midi, клетки CHO, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки Vero, клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T3, клетки F9, клетки SV-T2, клетки M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C3H/10T1/2, клетки HSDMiC3, клетки KLN205, клетки McCoy, L-клетки мыши, клетки штамма 2071 (L-клетки мыши), клетки штамма L-M (L-клетки мыши), клетки L-MTK' (L-клетки мыши), клетки клонов NCTC 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1, клетки Swiss/3T3, клетки индийского мунджака, клетки SIRC, клетки Cn и клетки Jensen, Sp2/0, NS0, клетки NS1 или их производные).

[44] В контексте данного документа термин «терапевтический белок» относится к любому белку, который можно вводить субъекту для лечения заболевания или нарушения. Терапевтический белок может представлять собой любой белок с фармакологическим эффектом, например, антитело, растворимый рецептор, конъюгат антитело-лекарственное

средство или фермент. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления терапевтический белок может представлять собой антитело к SARS-CoV-2, включая касиривимаб или имдевивамаб. Для достижения фармакологического эффекта, например, для предотвращения утечки вируса из-за мутации целевого вируса, можно совместно вводить несколько терапевтических белков. В контексте данного документа термин «коктейль из антител» относится к совместно вводимым терапевтическим белкам, содержащим по меньшей мере два терапевтических антитела. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления коктейль из антител может содержать REGEN-COV.

[45] В некоторых иллюстративных вариантах количество терапевтических белков в образце может составлять по меньшей мере два. В некоторых конкретных вариантах осуществления один из терапевтических белков может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, слитый белок или комплекс антитело-лекарственное средство. В некоторых других конкретных вариантах осуществления концентрация одного из терапевтических белков в образце может составлять от около 10 мкг/мл до около 2000 мкг/мл. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления количество терапевтических белков в образце составляет три. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления количество терапевтических белков в образце составляет четыре. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления количество терапевтических белков в образце составляет пять.

[46] В контексте данного документа «образец» может быть получен на любом этапе биопроцесса, таком как жидкость культуры клеток (CCF), собранная жидкость культуры клеток (HCCF), на любом этапе последующей обработки, причем лекарственное вещество (DS) или лекарственный продукт (DP) содержит конечный приготовленный продукт. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления образец может быть выбран на любом этапе последующего процесса осветления, хроматографического получения, вирусной инактивации или фильтрации.

[47] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления образец представляет собой биологический образец. В контексте данного документа термин «биологический образец» относится к образцу, взятому из живого организма, например,

человека или млекопитающего, отличного от человека. Биологический образец может содержать, например, цельную кровь, плазму, сыворотку, слюну, слезы, семенную жидкость, ткань щеки, ткань органа, мочу, фекалии, кожу или волосы. У пациента может быть взят образец, например клинический образец.

[48] В контексте данного документа термин «фармакокинетика» (ФК) относится к области исследований, посвященной характеристикам лекарственного средства после введения субъекту. Иллюстративные компоненты фармакокинетического анализа включают в себя высвобождение лекарственного средства из фармацевтической композиции, абсорбцию лекарственного средства в кровообращение, распределение лекарственного средства по организму, метаболизм (также называемый биотрансформацией) лекарственного средства в метаболиты и выведение лекарственного средства из организма. Фармакокинетика лекарственного средства представляет собой ключевую характеристику для оценки биотерапевтического кандидата. В частности, можно провести фармакокинетическое исследование для оценки того, как уровни лекарственного средства и его модифицированных форм и метаболитов изменяются с течением времени после введения субъекту. Биотерапевтические белки можно оценить посредством анализа репрезентативных пептидов, или «целевых пептидов», или «суррогатных пептидов» с использованием жидкостной хроматографии — масс-спектрометрии. Пептид может представлять собой подходящий целевой пептид, если он уникален или довольно репрезентативен для белка, например, определяющей комплементарность области антитела, и если его можно надежно выделить и измерить.

[49] В контексте данного документа 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 внутрь стационарной жидкости или твердой фазы. Неограничивающие примеры жидкостной хроматографии включают в себя обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия или хроматографию со смешанным режимом.

[50] В контексте данного документа термин «масс-спектрометр» включает в себя устройство, способное идентифицировать конкретные виды молекул и измерять их точные отношения массы к заряду. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в который может быть элюирован полипептид или пептид для характеристики. Масс-спектрометр может включать три основных части: источник ионов, массовый анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры определяемого вещества могут переноситься в газовую фазу и ионизированы одновременно (как в ионизации электрораспылением) или посредством отдельных способов. Выбор источника ионов зависит от области применения. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления изобретения масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр.

[51] В данном контексте термин «tандемная масс-спектрометрия» включает методику, в которой структурную информацию о молекулах образца получают посредством применения множества этапов массового отбора и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что молекулы пробы должны быть переведены в газовую фазу и ионизированы таким образом, чтобы фрагменты образовывались предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа массового отбора. Многоэтапная MS/MS или MSⁿ, может быть выполнена путем сначала выбора и выделения иона-предшественника, его фрагментации (MS2), выделения первичного фрагментного иона, его фрагментации (MS3), выделения вторичного фрагмента и т. д. (MS4) до тех пор, пока можно получить значимую информацию или можно обнаружить сигнал фрагментарного иона. Tandемную MS успешно выполняли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализатора для конкретного применения может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Двумя основными категориями способов tandemной MS являются «tандем в пространстве» и «tандем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «tандем во времени» сопряжены в пространстве или с анализаторами «tандем в пространстве». Масс-спектрометр «tандем в пространстве» включает источник ионов, устройство активации ионов-прекурсоров и по меньшей мере два не-захватных масс-анализатора. Конкретные функции разделения m/z могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной

секции прибора происходила селекция ионов, затем диссоциация в промежуточной области и передача ионов продукта в другой анализатор для разделения по m/z и сбора данных. В масс-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.

[52] Выявленные масс-спектрометром пептиды можно использовать в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно использовать для определения характеристик белков путем сопоставления экспериментальных и теоретических данных МС/МС, при этом последние генерируются по возможным пептидам в базе данных белковых последовательностей. Определение характеристик включает, помимо прочего, секвенирование аминокислот фрагментов белка, определение секвенирования белка, определение секвенирования белка *de novo*, определение локализации посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

[53] 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 Swiss-prot. Поиск в базах данных может осуществляться с использованием того, что в дальнейшем именуемое «инструментами 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).

[54] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления изобретения масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии.

[55] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления изобретения масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии-мониторинга множественных реакций. В целом, как правило, масс-спектрометр способен проводить анализ с помощью мониторинга выбранных реакций (SRM), включая мониторинг последовательных реакций (CRM) и мониторинг параллельных реакций (PRM).

[56] В контексте данного документа термин «мониторинг множественных реакций» или «ММР» относится к методу, основанному на масс-спектрометрии, который может точно определять количество малых молекул, пептидов и белков в сложных матрицах с высокой чувствительностью, специфичностью и широким динамическим диапазоном (Paola Picotti & Ruedi Aebersold, Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions, 9 NATURE METHODS 555–566 (2012)). ММР, как правило, можно проводить с помощью тройных квадрупольных масс-спектрометров, в которых ион-предшественник, соответствующий выбранным малым молекулам/пептидам, выбирается в первом квадруполе, а фрагмент иона-предшественника выбирается для мониторинга в третьем квадруполе (Yong Seok Choi et al., Targeted human cerebrospinal fluid proteomics for the validation of multiple Alzheimers disease biomarker candidates, 930 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 129–135 (2013)).

[57] В некоторых аспектах, масс-спектрометр в способе или системе по настоящей заявке может быть масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометром с тройным квадруполем, при этом масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии, при этом масс-спектрометр способен выполнять анализы ЖХ-МС (жидкостная хроматография-масс-спектрометрия) или ЖХ-МРМ-МС (жидкостная хроматография-мониторинг множественных реакций-масс-спектрометрия).

[58] 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.

[59] 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, химоотрипсин, 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 методы 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)).

[60] Количество расщепляющего фермента и время, необходимое для расщепления, можно выбрать соответствующим образом. Когда отношение фермента к субстрату недопустимо высокое, соответствующая высокая скорость расщепления не даст достаточно времени для анализа пептидов с помощью масс-спектрометра, и покрытие последовательности будет поставлено под угрозу. С другой стороны, при низком соотношении фермента и субстрата потребуется длительное время расщепления и, следовательно, длительное время сбора данных. Соотношение фермента и субстрата может составлять от около 1:0,5 до около 1:200.

[61] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ количественного определения терапевтического белка может необязательно включать в себя приведение терапевтического белка в контакт с агентом, восстанавливающим белок.

[62] В контексте данного документа термин «агент, восстанавливающий белок» относится к агенту, используемому для восстановления дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающими примерами агентов, восстанавливающих белок, являются

дитиотреитол (DTT), β -меркаптоэтанол, реактив Элмана, гидрохлорид гидроксилamina, цианоборгидрид натрия, гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCPE-HCl) или их комбинации.

[63] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ количественного определения белка может необязательно включать в себя приведение терапевтического белка в контакт с агентом, алкилирующим белок.

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

[65] В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ количественного определения терапевтического белка может включать в себя денатурирование терапевтического белка.

[66] В контексте данного документа термин «денатурирование белка» может относиться к процессу, в котором трехмерная форма молекулы изменяется по сравнению с ее нативным состоянием. Денатурирование белка можно осуществлять с использованием агента, денатурирующего белок. Неограничивающие примеры агента, денатурирующего белок, включают в себя нагревание, высокий или низкий pH, восстанавливающие агенты, такие как DTT (см. ниже), или воздействие хаотропных агентов. Некоторые хаотропные агенты можно использовать в качестве агентов, денатурирующих белок. 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 в себя бутанол, этанол, хлорид гуанидиния, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину, N-лауроилсаркозин, мочевины и их соли.

[67] Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается каким-либо из вышеуказанного терапевтического белка (белков), коктейля (коктейлей) из антител, клетки (клеток) хозяина, агента (агентов), денатурирующего белок, алкилирующего агента

(агентов), агента (агентов), восстанавливающего белок, расщепляющего фермента (ферментов), масс-анализатора (анализаторов), прибора (приборов), используемого для идентификации, или хроматографического способа (способов), и любой терапевтический белок (белки), коктейль (коктейли) из антител, клетка (клетки) хозяина, агент (агенты), денатурирующий белок, алкилирующий агент (агенты), агент (агенты), восстанавливающий белок, расщепляющий фермент (ферменты), масс-анализатор (масс-анализаторы), прибор (приборы), используемый для идентификации, или хроматографический способ (способы) могут быть выбраны любым подходящим способом.

[68] Настоящее изобретение можно лучше понять со ссылкой на следующие примеры. Однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

[69] Общая последовательность операций анализа ЖХ-ММР-МС/МС по изобретению в соответствии с одним иллюстративным вариантом осуществления проиллюстрирована на ФИГ. 1.

[70] Химические вещества и реагенты. Гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР-НCl), трифторуксусная кислота (TFA), 0,1% муравьиная кислота (об./об.) в воде (класс ЖХ-МС) и 0,1% муравьиная кислота (об./об.) в ацетонитриле (класс ЖХ-МС) были приобретены у Thermo Fisher Scientific (Рокфорд, штат Иллинойс). Сверхчистый 1 М трис-НCl, pH 8,0, был получен от Invitrogen (Карлсбад, штат Калифорния). Мочевина и йодацетамид (IAM) были приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури). Трипсин (масс-спектрометрический класс) и gAspN были приобретены у Promega (Мэдисон, штат Висконсин). Смешанная сыворотка человека и отдельная сыворотка человека от 10 индивидуумов были приобретены у Innovative Research (Нови, штат Мичиган). Специальные синтетические тяжелые пептиды класса AUQA для внутренних стандартов (IS), LLIYAASNLETGVPSR*(10 Da), DTAV*(6Da) YYCASGS, были заказаны у Thermo Fisher Scientific (Рокфорд, штат Иллинойс). Лекарственное вещество (DS) mAt1 и mAt2 было разработано и получено от Regeneron Pharmaceuticals (Тэрритаун, штат Нью-Йорк). Образцы сыворотки пациентов с COVID-19

были взяты из клинического исследования REGEN-COV, спонсированного Regeneron Pharmaceuticals (идентификатор ClinicalTrials.gov: NCT04425629).

[71] Получение стандартных растворов. Исходные растворы REGEN-COV в сыворотке человека получали путем добавления DS мАт1 и мАт2 в смешанную сыворотку человека. Калибровочные стандарты (20, 25, 30, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 мкг/мл для мАт1; 10, 20, 25, 30, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 мкг/мл для мАт2) получали путем серийного разведения исходного раствора с использованием смешанной сыворотки человека. Пять квалификационных стандартов QC, включая верхний предел количественного определения (ULOQ, 2000 мкг/мл мАт1, 2000 мкг/мл мАт2), высокий QC (HQC, 1500 мкг/мл мАт1, 1500 мкг/мл мАт2), средний QC (MQC, 750 мкг/мл мАт1, 750 мкг/мл мАт2), низкий QC (LQC, 60 мкг/мл мАт1, 30 мкг/мл мАт2) и нижний предел количественного определения (LLOQ, 20 мкг/мл мАт1, 10 мкг/мл мАт2), также были получены путем добавления мАт1 и мАт2 DS в смешанную сыворотку человека и серийных разведений.

[72] LLOQ (20 мкг/мл мАт1, 10 мкг/мл мАт2) с добавленными отдельными образцами сыворотки человека получали путем совместного добавления мАт1 и мАт2 DS в десять отдельных холостых растворов сыворотки человека. Для анализа специфичности лекарственного средства стандарты QC, содержащие одно лекарственное средство, получали путем серийного разведения исходного раствора антитела-лекарственного средства с использованием смешанной сыворотки человека в качестве разбавителя. Стандарты QC, содержащие одно лекарственное средство в присутствии совместно вводимого лекарственного средства в качестве фона матрицы, были получены путем серийного разведения исходного раствора с использованием 2 мг/мл совместно вводимого лекарственного средства в смешанной сыворотке человека в качестве разбавителя.

[73] Расщепление образцов сыворотки. Перед обработкой образцов образцы сыворотки (калибровочные стандарты, стандарты QC и образцы пациентов) оттаивали на льду. Расщепление образцов сыворотки проводили в 96-луночной планшете (0,5 мл, полипропилен, Agilent Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния). 5 мкл образца сыворотки добавляли в каждую лунку для образца, предварительно заполненную 80 мкл денатурирующего раствора (10 mM TCEP, 8 M мочевины). 96-луночный планшет герметизировали с помощью клейкой мембраны для планшета (Waters, Милфорд, штат

Массачусетс) и нагревали при 80 °С в течение 10 минут на термомиксере С (Eppendorf, Гамбург, Германия) при 650 об/мин. После охлаждения до комнатной температуры в каждую лунку для образца добавляли по 15 мкл 0,25 М IAM, и планшет инкубировали при встряхивании со скоростью 650 об/мин в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре. Перед использованием готовили раствор для расщепления, содержащий два фермента и два IS-пептида, путем разведения 200 мкг трипсина, 100 мкг гAspN, 150 мкл исходного раствора IS мАт1 (5 пмоль/мкл) и 100 мкл маточного раствора IS мАт2 (5 пмоль/мкл) в 9 мл 0,1 М трис-буфера. После алкилирования 10 мкл каждого образца переносили во второй 96-луночный планшет и смешивали с 90 мкл раствора для расщепления, содержащего два фермента и IS-пептиды. Планшет для образцов герметизировали и инкубировали при 37 °С в течение 3 часов при встряхивании со скоростью 650 об/мин. По завершении расщепления в каждую лунку для образца добавляли по 10 мкл 10% TFA для гашения реакции. Планшет для образцов вращали при 700 об/мин в течение 1 минуты перед анализом ЖХ-ММР-МС.

[74] Способы ЖХ-ММР-МС. Эксперименты ЖХ-ММР-МС проводили с использованием системы UPLC Agilent Infinity II в сочетании с тройным квадрупольным масс-спектрометром 6495 (Agilent Technologies, Санта-Клара, штат Калифорния). 10 мкл образца расщепленной сыворотки, что соответствует приблизительно 45 нл исходной сыворотки, загружали в колонку C18 (ACQUITY UPLC BEH300 1,7 мкм, 2,1 мм x 100 мм, Waters) и разделяли элюированием в обращенно-фазовом градиенте с использованием подвижной фазы А в виде 0,1% муравьиной кислоты в воде и подвижной фазы В в виде 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле при скорости потока 0,3 мл/мин. Перед каждым введением путь ввода пробы последовательно промывали IPA/ACN/H₂O об/об/об (3:1:1), ACN/H₂O/FA об/об/об (25:75:0,1) и ACN/H₂O/FA об/об/об (5:95:0,1). Градиент ЖХ для экспериментов ММР был установлен следующим образом: 0-0,5 мин, 5% В; 0,5-16 мин, 5-25% В; 16-18 мин, 25~90% В; 18-20 мин, 90% В; 20-20,5 мин, 90~5 % В и 20,5~25,5 % В. Температура колонки была установлена на уровне 60 °С, а температуру автосэмплера поддерживали на уровне 7 °С во время анализа образцов.

[75] Параметры трехквадрупольного источника ионов MS были установлены следующим образом: температура газа 200 °С, скорость потока газа 12 л/мин, газ в распылителе 20 фунтов на квадратный дюйм, температура оболочки 300 °С, скорость

потока газа 1 л/мин, капиллярное напряжение 3500 В, напряжение на сопле 500 В.

Запланированные по времени переходы ММР для двух суррогатных пептидов и двух IS-пептидов с параметрами каждого канала перехода, перечисленными в таблице 1-1 и таблице 1-2, применялись для всех экспериментов по количественному анализу.

Таблица 1-1. Запланированные по времени переходы ММР для сбора данных ЖХ-ММР-МС

Вре мя	Лекарствен ное средство	Пептид	Заряд предшествен ника	Тип продук та	Предшествен ник Ион	Ион продук та
3,0- 10,0 мин	мАт2	DTAVYYC (Cam)ASGS	2	y ⁵⁺	597,6	481,2
		DTAV*(6Da) YYC(Cam)A SGS	2	y ⁵⁺	600,6	487,2
10,0- 16,0 мин	мАт1	LLIYAASN LETGVPSR	2	y ³⁺	853,0	359,2
		LLIYAAS NLETGVPS R* (10Da)	2	y ³⁺	858,0	369,2

Таблица 1-2. Запланированные по времени переходы ММР для сбора данных ЖХ-ММР-МС

Время	Лекарственное средство	Время выдержки (мс)	Фрагментор	СЕ	Напряжение клеточного ускорителя
3,0-10,0 мин	мАт2	300	380	6	5
		300	380	6	5
10,0-16,0 мин	мАт1	300	380	18	5
		300	380	18	5

[76] Анализ данных. Необработанные данные экспериментов ЖХ-ММР-МС анализировали с использованием программного обеспечения Agilent MassHunter Quantitative Analysis. Площади пиков хроматограммы экстрагированных ионов (XIC) отслеживаемых переходов были интегрированы с помощью алгоритма Agile2. Чтобы построить калибровочную кривую для каждого лекарственного средства, площади пиков суррогатного пептида из калибровочных стандартов, нормализованные по площадям пиков соответствующего коэлюирующего IS-пептида, были построены в отношении их соответствующих номинальных концентраций с использованием взвешенной квадратичной модели $1/x^2$ с тремя параметрами (с переменным весовым коэффициентом для каждой точки стандартной кривой), на основании которой впоследствии рассчитывали все остальные показания. Уравнение для квадратичной аппроксимации является следующим: $y = ax^2 + bx + c$, где y = отношение площади пика XIC суррогатного пептида и площади пика соответствующего IS-пептида, x = концентрация лекарственного средства (мкг/мл) и a , b , c = квадратичный коэффициент, линейный коэффициент и свободный член соответственно. Весовой коэффициент каждой точки стандартной кривой обратно пропорционален концентрации аналита. Параметры калибровочной кривой были автоматически рассчитаны с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter Quantitative Analysis.

[77] Электрохемилюминесцентный иммунологический анализ. В процедурах анализа использовали микропланшеты со стрептавидином, покрытые либо биотинилированными мышинными моноклональными антителами к мАт1, либо биотинилированными мышинными моноклональными антителами к мАт2. мАт1 и мАт2, захваченные на пластинах, специфичных для каждой молекулы, были обнаружены с использованием двух рутенилированных неконкурирующих мышинных моноклональных антител, специфичных либо к мАт1, либо к мАт2. Электрохемилюминесцентный сигнал, создаваемый рутениевой меткой при подаче напряжения на пластину, измеряли с помощью MSD-ридера. Измеренная электрохемилюминесценция пропорциональна концентрации общего количества мАт1 или общего количества мАт2 в образцах сыворотки.

Пример 1. Разработка способа анализа ММР

[78] Как mAt1, так и mAt2 представляют собой димерные молекулы, состоящие из пары легких цепей и пары тяжелых цепей. Легкая цепь mAt1 содержит 221 аминокислотный остаток, а его тяжелая цепь содержит 450 аминокислотных остатков. Легкая цепь mAt2 содержит 216 аминокислотных остатков, а его тяжелая цепь — 450 аминокислотных остатков. Поскольку белки IgG широко распространены в сыворотке человека, и более 93% аминокислотных последовательностей этих двух гуманизированных лекарственных средств IgG1 идентичны эндогенному сывороточному IgG, выбор подходящих суррогатных пептидов для количественного определения лекарственного средства IgG антител IgG на основании MMP ограничивается пептидами, полученными из областей CDR (как правило, 3 из тяжелой цепи, 3 из легкой цепи) переменных доменов. Пептиды константных областей невозможно отличить от пептидов, полученных из эндогенных антител в сыворотке человека.

[79] Чтобы выбрать подходящие суррогатные пептиды для количественного определения MMP, были применены следующие соображения для скрининга пептидов-кандидатов, полученных путем протеазного расщепления в области CDR лекарственных средств IgG человека: 1) в базе данных протеомов человека Uniprot (www.uniprot.org/blast/) нет идентичных совпадений с BLAST; 2) длина пептида короче 20 аминокислотных остатков; 3) последовательность не содержит сайтов, склонных к пропуску расщепления при ферментативном расщеплении, таких как KR, RDR для расщепления трипсином; и 4) последовательность не содержит сайтов, подверженных биотрансформации *in vivo*, или остатков, склонных к частичной модификации во время обработки образца, таких как метионин. Путем применения этих критериев для изучения пептидов CDR mAt1 и mAt2, образующихся в результате расщепления трипсином *in silico*, было обнаружено, что только один пептид, LLIYAASNLETGVPSR, который происходит из CDR2 легкой цепи mAt1, может служить суррогатным пептидом для количественного определения mAt1. Ни один из триптических пептидов из областей CDR mAt2 не мог удовлетворять всем критериям, перечисленным выше, как показано в таблице 2-1. В этом случае другую протеазу, rAspN, использовали для создания уникального суррогатного пептида соответствующей длины из CDR3 тяжелой цепи, DTAVYYCASGS, для количественного определения mAt2, как показано в таблице 2-2. Последовательности

области CDR обозначены жирным шрифтом. Причины исключения пептида в качестве суррогатного пептида MMP для разработки способа MMP отмечены знаком «х».

Таблица 2-1. Прогнозирование пептидных последовательностей, содержащих CDR, путем расщепления трипсином мАт1 и мАт2.

	Область CDR	Пептидная последовательность	Длина пептида короче 20	Идентичное совпадение последовательностей по BLAST	Мод. РТМ (Met)
мАт1	HC_CDR1	LSCAAS GFTFSDYY MSWIR		x	x
	HC_CDR2	GLEWVS ITYSGSTIYY ADSVK	x		
	HC_CDR3	AEDTAVYY CAR		x	
	HC_CDR3	GTTMVPFDYW GQGLVTVSSASTK			x
	LC_CDR1	VTITCQAS QDITNY LNWYQQKPGK	x		
	LC_CDR2	LLIYAASNLETGVPSR			
	LC_CDR3	FSGSGSGTDFTF TISGLQ PEDIATYYC QQYDNLPLTF GGG TK	x		
мАт2	HC_CDR1	LSCAAS GFTFSNY AMYWVR			x
	HC_CDR2	GLEWVAVIS YDGSNK		x	
	HC_CDR3	TEDTAVYYC ASGSDYGDYLLVY WGQGLVTVSSASTK	x		
	LC_CDR1	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVG GYN YVSWYQQH PGK	x	x	
	LC_CDR2	LMIY DVSK		x	
	LC_CDR3	SGNTASLTISGLQSEDEADYYCNSLTS ISTWV FGG GTK	x		

Таблица 2-2. Прогнозирование пептидных последовательностей, содержащих CDR, путем комбинированного расщепления мАт2 трипсином и AspN.

	Область CDR	Пептидная последовательность	Длина пептида короче 20	Идентичное совпадение последовательностей по BLAST	Мод . PT M (Met)
мАт2	HC_CD R1	LSCAASGFTFSNYAMYWVR			x
	HC_CD R2	GLEWVAVISY		x	
	HC_CD R2	DGSNK		x	
	HC_CD R3	DTAVYYCASGS			
	HC_CD R3	DYLLVYWGGTLVTVSSAST K	x		
	LC_CDR 1	QSALTQPASVSGSPGQSITISCT GTSS	x	x	
	LC_CDR 1	DVGGYNYVSWYQQHPGK		x	
	LC_CDR 2	DVSK		x	
	LC_CDR 3	DYYCNSLTSISTWVFGGGTK	x		

[80] Трипсиновые гидролизаты лекарственного вещества мАт1 и гидролизаты гAspN лекарственного вещества мАт2 использовали для оптимизации параметров перехода ММР в системе Agilent QQQ. Были проведены запланированные по времени эксперименты по сканированию ионов продукт для кандидатов-суррогатных пептидов во время разделения обращенно-фазовой ЖХ, чтобы выбрать наилучшую энергию перехода и соударений. На основании полученных спектров CID МС/МС переход от иона предшественника +2 к иону продукта у3 был выбран для мониторинга содержания суррогатного пептида мАт1 LLIYAASNLETGVPSR (ФИГ. 2А); и переход от иона предшественника +2 к иону продукта у5 был выбран для мониторинга содержания алкилированного суррогатного пептида мАт2 DTAVYYC(Cam)ASGS (ФИГ. 2В). Примечательно, что оптимальная энергия соударений для этого двухзарядного

суррогатного пептида мАт2 составляет около 5 В, что намного меньше по сравнению с типичной энергией соударений, необходимой для двухзарядных триптических пептидов.

[81] Выбранные каналы перехода суррогатных пептидов и соответствующие им переходы для пептидов внутренних стандартов исследовали на предмет фоновых помех матрицы сыворотки человека. Холостой раствор смешанной сыворотки человека, а также 10 отдельных холостых образцов сыворотки (5 самок, 5 самцов), расщепленных комбинацией трипсина и гAspN, анализировали с помощью 16-минутного обращенно-фазового градиента ЖХ и запланированного по времени получения ММР четырех переходных каналов. Помехи сигналов не наблюдались ни со стороны легких, ни со стороны тяжелых переходных каналов двух суррогатных пептидов. После оценки матричных помех выбранных переходов для двух суррогатных пептидов параметры прибора были дополнительно оптимизированы в режиме ММР, а параметры, перечисленные в таблице 1-1 и таблице 1-2, были применены для квалификации анализа и анализа образцов пациентов.

Пример 2. Квалификация анализа ЖХ-ММР-МС

[82] Перед применением к анализу клинических образцов эффективность разработанного анализа ЖХ-ММР-МС оценивали с использованием следующих наиболее критически важных параметров: 1) линейность, 2) точность и прецизионность, 3) селективность, 4) специфичность и 5) стабильность аналита до и после расщепления образца.

2.1 Линейность

[83] Линейность относится к пропорциональности ответа прибора на стандартные концентрации с использованием соответствующей статистической модели линейной или нелинейной регрессии. В этом анализе ЖХ-ММР-МС линейность определяли по нормализованным площадям пиков хроматограммы экстрагированных ионов (ХИС) девяти ненулевых стандартов для мАт1 и десяти ненулевых стандартов для мАт2 в течение трех суток. Репрезентативные ХИС суррогатных пептидов и IS-пептидов из калибровочных стандартов, а также калибровочные кривые для двух лекарственных средств антител показаны на ФИГ. 3. Обратно рассчитанные концентрации лекарственного средства в калибровочных стандартах с использованием нормализованных ответов и

соответствующего уравнения стандартной кривой использовали для оценки точности стандартов с использованием следующего уравнения.

[84] Точность % (% ACC) = 100 % × (измеренная концентрация / номинальная концентрация).

[85] Статистический профиль измеренных концентраций ненулевых стандартов для обоих лекарственных средств из трех независимых экспериментов суммирован в таблице 3 и таблице 4. Средние значения % ACC для всех стандартов находились в диапазоне от 89% до 105% для МАТ1 и от 92% до 106% для МАТ2. CV % (коэффициент вариации) измеренных значений концентрации для всех ненулевых стандартов варьировал от 2,6% до 11% для МАТ1 и от 0,7% до 12% для МАТ2. Эти результаты соответствовали критериям биоанализа, согласно которым % ACC должен находиться в пределах $\pm 20\%$ от номинального значения для ненулевых стандартов, за исключением стандартов на уровне LLOQ или ULOQ, которые должны находиться в пределах $\pm 25\%$; и CV % должен составлять $\leq 20\%$ для всех ненулевых стандартов, за исключением стандартов на уровне LLOQ или ULOQ, которые должны составлять $\leq 25\%$.

Таблица 3. Точность и прецизионность для всех ненулевых стандартов МАТ1 по результатам трех независимых экспериментов

Калибровочный стандарт МАТ1 номинальная конц. (мкг/мл)	Планшет 1 ACC %	Планшет 2 ACC %	Планшет 3 ACC %	Средний % ACC	CV %
20	78	97	92	89	10,8
25	104	99	113	105	6,9
30	101	109	96	102	6,3
50	113	96	99	103	8,7
100	109	103	101	104	3,8
250	100	91	99	96	4,8
500	109	100	96	102	6,4
1000	93	109	104	102	8,3
2000	101	96	99	99	2,6

Таблица 4. Точность и прецизионность для всех ненулевых стандартов мАт2 по результатам трех независимых экспериментов

Номинальная конц. (мкг/мл) по калибровочному стандарту мАт2	Планшет 1 АСС %	Планшет 2 АСС %	Планшет 3 АСС %	Средний % АСС	CV %
10	80	94	101	92	11,6
20	91	104	93	96	7,4
25	104	104	108	105	2,1
30	109	111	97	106	7,3
50	114	96	101	103	8,9
100	111	102	103	105	4,5
250	99	89	100	96	6,1
500	108	97	97	101	6,0
1000	93	102	101	99	5,2
2000	102	101	100	101	0,7

2.2 Точность и прецизионность

[86] Точность относится к степени соответствия между измеренным результатом и его теоретическим истинным значением и выражается в процентной точности (% АСС).

Прецизионность относится к количественной мере случайной вариации между повторными измерениями одного и того же образца, которая выражается в процентах коэффициента вариации (конц. CV %). Внутрисуточную точность и прецизионность определяли с помощью пяти повторов квалификационного QC на цикл, полученных, как описано выше в разделе «**Получение стандартных растворов**», в трех независимых измерениях в течение трех суток. Межсуточную точность и прецизионность определяли с помощью трех независимых измерений от получения образцов до анализа ЖХ-МС/МС, каждый с пятью повторами квалификационного QC в течение трех суток. Данные по

параметрам внутрисуточной и междосуточной точности и прецизионности представлены в таблице 5-1, таблице 5-2 и таблице 5-3.

Таблица 5-1. Внутрисуточная (N=5) точность и прецизионность мАт1 на пяти уровнях QC для анализа ЖХ-ММР-МС.

Стандарты QC		Внутрисуточная повторность 1 (N=5)		Внутрисуточная повторность 2 (N=5)		Внутрисуточная повторность 3 (N=5)	
Урове нь	Номинальн ая конц. (мкг/мл)	Средни й ACC%	Прецизионно сть	Средни й ACC%	Прецизионно сть	Средни й ACC%	Прецизионно сть
LLOQ	20	114	0,02	89	0,03	100	0,06
LQC	60	98	0,01	92	0,04	96	0,03
MQC	750	107	0,03	99	0,02	100	0,02
HQC	1500	107	0,03	99	0,03	100	0,02
ULOQ	2000	105	0,02	99	0,05	106	0,06

Таблица 5-2. Внутрисуточная (N=5) точность и прецизионность мАт2 на пяти уровнях QC для анализа ЖХ-ММР-МС.

Стандарты QC		Внутрисуточная повторность 1 (N=5)		Внутрисуточная повторность 2 (N=5)		Внутрисуточная повторность 3 (N=5)	
Уровень	Номинальная конц. (мкг/мл)	Средний ACC%	Прецизионность	Средний ACC%	Прецизионность	Средний ACC%	Прецизионность
LLOQ	10	111	0,07	93	0,06	107	0,09
LQC	30	100	0,03	92	0,02	96	0,05
MQC	750	107	0,02	102	0,02	102	0,02
HQC	1500	106	0,03	98	0,03	102	0,02
ULOQ	2000	101	0,03	110	0,04	106	0,02

Таблица 5-3. Межсуточная (N=3) точность и прецизионность мАт1 и мАт2 на пяти уровнях QC для анализа ЖХ-MMP-МС.

Стандарты QC			Межсуточная (N=3)			
Уровень	мАт1	мАт2	мАт1	мАт2	мАт1	мАт2
	Номинальная конц. (мкг/мл)	Номинальная конц. (мкг/мл)	Средний ACC%	Прецизионность	Средний ACC%	Прецизионность
LLOQ	20	10	101	0,13	104	0,09
LQC	60	30	95	0,03	96	0,04
MQC	750	750	102	0,04	103	0,03
HQC	1500	1500	102	0,04	102	0,04
ULOQ	2000	2000	103	0,03	106	0,04

[87] Статистический профиль оценки межсуточной точности и прецизионности показывает, что % значений АСС для мАт1 на всех пяти уровнях QC находился в диапазоне от 95% до 103%, а % значений АСС для мАт2 на всех пяти уровнях QC находился в диапазоне от 96% до 106%. Межсуточные значения конц. CV % для всех QC варьировался в пределах 3% и 13% для мАт1 и 3% и 9% для мАт2. При внутрисуточной оценке значения % АСС для мАт1 в пяти QC находились в диапазоне от 89% до 114%, причем значения конц. CV % находились в диапазоне от 1% до 6%, а значения % АСС для мАт2 в пяти QC находились в диапазоне от 92% до 111%, со значениями конц. CV % от 2% до 9%. Эти результаты продемонстрировали, что как для мАт1, так и для мАт2 внутрисуточная и межсуточная точность этого анализа ЖХ-ММР-МС составляет от 80% до 120% для НQC, MQC и LQC и от 75% до 125% для LLOQ и ULOQ. Как внутрисуточный, так и межсуточный CV % измеренной концентрации находится в пределах 20% для НQC, MQC и LQC и в пределах 25% для LLOQ и ULOQ.

2.3 Селективность

[88] Селективность относится к селективному и специфическому количественному определению аналита в присутствии различных эндогенных и неспецифических для анализа компонентов матрицы. Набор из десяти отдельных образцов сыворотки человека, не подвергавшихся воздействию, был проанализирован для проверки того, подвергался ли анализ неспецифическим матричным помехам. Было показано, что как для мАт1, так и для мАт2 все образцы были ниже предела количественного определения (BLQ), который составляет 20 мкг/мл для мАт1 и 10 мкг/мл для мАт2. Дополнительные доказательства селективности оценивали путем оценки точности отдельных не подвергавшихся воздействию образцов сыворотки человека, в которые добавляли LLOQ. Как показано на ФИГ. 4, для каждого из десяти отдельных образцов сыворотки, в которые были добавлены 20 мкг/мл мАт1 и 10 мкг/мл мАт2, измеренные концентрации мАт1 находились в пределах $\pm 25\%$ от номинального значения, причем значения % АСС находились в диапазоне от 92% до 116%. Значения % АСС для мАт2 находились в диапазоне от 87% до 126%, причем измеренная концентрация мАт2 в одном образце находилась в пределах $\pm 25\%$ от номинального значения. Все эти результаты соответствовали критериям приемлемости, указанным в «Руководстве по валидации биоаналитических способов для промышленности», согласно которому по

меньшей мере 80% не подвергавшихся воздействию образцов с добавлением LLOQ должны соответствовать критериям приемлемости % АСС в пределах $\pm 25\%$ от номинального значения (Министерство здравоохранения и социальные службы США, Управление по контролю за продуктами и лекарственными средствами, Центр оценки и исследований лекарственных средств, Центр ветеринарной медицины. Руководство по валидации биоаналитических способов для промышленности, 2018 г.).

[89] На основании этих оценок было продемонстрировано, что разработанный анализ ЖХ-ММР-МС является селективным для образцов сыворотки человека, содержащих мАт1 и мАт2. Кроме того, результаты, полученные в случае образцов с добавлением LLOQ, подтвердили, что анализ в чистой сыворотке может количественно определять общее количество мАт1 до 20 мкг/мл и общего количества мАт2 до 10 мкг/мл, дополнительно устанавливая LLOQ для анализа ММР.

2.4 Специфичность

[90] Специфичность относится к способности способа оценивать аналит в присутствии других компонентов, присутствие которых ожидается. Поскольку мАт1 и мАт2 совместно вводят в рамках терапии коктейлем из антител, оценивали помехи со стороны сопутствующих лечебных препаратов на специфичность способа каждого лекарственного средства. Как показано в ХИС на ФИГ. 5, сигнал от переходного канала суррогатных пептидов мАт1 (m/z 853,0 $\rightarrow$ m/z 359,2) при времени удерживания 14 минут не обнаруживался в 2 мг/мл мАт2 в сыворотке человека (ФИГ. 5А). Аналогичный ответ наблюдался для сигнала переходного канала мАт2 (m/z 597,6 $\rightarrow$ m/z 481,2) в образце 2 мг/мл мАт1 в сыворотке человека (ФИГ. 5В).

[91] Для систематической оценки специфичности лекарственного средства для каждого лекарственного средства точность стандартов QC, полученных для одного лекарственного средства в отдельности, сравнивали с точностью стандартов QC, содержащих 2 мг/мл совместно вводимого лекарственного средства, на пяти различных уровнях концентрации QC. Значения % АСС для QC мАт1 находились в диапазоне от 98% до 103% без присутствия мАт2, что было сопоставимо с диапазоном % АСС (от 97% до 120%), измеренным для QC мАт1 с 2 мг/мл мАт2 в сыворотке (ФИГ. 5С). Значения % АСС для QC мАт2 находились в диапазоне от 100% до 114% без присутствия мАт1, что также было сопоставимо с диапазоном % АСС (от 96% до 108%), измеренным для QC

мАт2 с добавлением 2 мг/мл мАт1 в сыворотку (ФИГ. 5D). Значения % АСС для QC для каждого лекарственного средства на всех пяти уровнях QC с присутствием и совместно вводимого лекарственного средства или без него, соответствовали критериям приемлемости % АСС в пределах $\pm 20\%$ от номинального значения, за исключением % АСС для ULOQ и LLOQ в пределах $\pm 25\%$ от номинального значения.

2.5 Стабильность аналита

[92] Стабильность аналита относится к способности точно измерять аналит в пределах критериев приемлемости анализа после того, как образец подвергся нагрузке или различным условиям хранения. Для соответствия цели этого анализа оценивали стабильность интактного терапевтического белка в сыворотке человека после воздействия трех циклов замораживания/оттаивания (FT) и стабильность расщепленного аналита во время хранения в автосэмплере UPLC.

[93] Для оценки стабильности аналита в условиях циклов замораживания/оттаивания пять повторов ULOQ, HQC, MQC и LQC замораживали/размораживали в течение трех циклов перед расщеплением. Для оценки стабильности аналита в автосэмплере прибора анализировали пять повторов ULOQ, HQC, MQC, LQC и LLOQ после 72 часов хранения при 7 °C в автосэмплере. Измеренную точность свежих образцов QC сравнивали с точностью образцов QC, подвергнутых циклам замораживания/оттаивания перед расщеплением, а также образцов QC, хранившихся в течение долгих часов в автосэмплере после расщепления. Как показано на ФИГ. 6, для оцениваемых условий не наблюдалось существенных изменений точности измерения концентраций лекарственного средства. Все QC соответствовали критериям приемлемости % АСС для всех QC в пределах $\pm 20\%$ от номинального значения, за исключением % АСС для ULOQ в пределах $\pm 25\%$ от номинального значения, что указывает на то, что как мАт1, так и мАт2 стабильны в сыворотке человека в тестируемых условиях, и эту стабильность можно точно оценить с помощью способа по изобретению.

Пример 3. Измерение концентраций REGEN-COV в образцах сыворотки пациентов с COVID-19

[94] В связи с насущной необходимостью в надежном количественном фармакокинетическом анализе для определения характеристик REGEN-COV разработанный анализ ЖХ-ММР-МС служил промежуточным способом определения

общих концентраций мАт1 и мАт2 в образцах сыворотки пациентов, собранных в клинических исследованиях фазы I REGEN-COV у амбулаторных пациентов с COVID-19 (Weinrich *et al.*). Пациенты, участвовавшие в двойном слепом клиническом исследовании, были рандомизированы (1:1:1) для приема плацебо, 2,4 г REGEN-COV (1,2 г каждого антитела) или 8,0 г REGEN-COV (4 г каждого антитела) путем внутривенной инъекции. Образцы сыворотки собирали у пациентов в группах дозирования 2,4 г и 8,0 г перед введением дозы, через 1 час после инфузии лекарственного средства, а также через 2, 4, 6, 14 и 28 суток после введения лекарственного средства и анализировали с помощью анализа ЖХ-ММР-МС по изобретению.

[95] Калибровочные стандарты, а также стандарты QC на четырех уровнях концентрации в трех экземплярах (LLOQ, LQC, MQC, HQC) расщепляли и анализировали вместе с каждой партией образцов пациентов. Критерии приемлемости цикла для анализа ЖХ-ММР-МС определяли по процентной точности ненулевых калибровочных стандартов, а также процентной точности и коэффициентам вариации QC. Точность измеренной концентрации калибровочного стандарта должна быть в пределах 25% от номинальной концентрации при LLOQ и в пределах 20% от номинальной концентрации при всех других концентрациях. По меньшей мере две трети измеренных концентраций QC должны находиться в пределах 20% или 25% (LLOQ) от их соответствующих номинальных значений. По меньшей мере два повтора QC на каждом уровне должны находиться в пределах 20% или 25% (LLOQ) от их номинальных концентраций. Критерии приемлемости точности определяют на каждом уровне концентрации, и они должны находиться в пределах 20%. Все измеренные образцы сыворотки пациентов перед введением дозы имели ответы ниже LLOQ как для мАт1, так и для мАт2, что дополнительно валидировало селективность этого анализа ЖХ-ММР-МС.

[96] Временной профиль концентрации лекарственного средства в сыворотке после инъекции однократной дозы использовали для определения фармакокинетических параметров мАт1 и мАт2, как показано на ФИГ. 7. Результаты продемонстрировали, что концентрация лекарственного средства антитела достигает максимума в течение 1 часа после внутривенной инъекции и со временем снижается. Фармакокинетика каждого антитела была линейной и пропорциональной дозе, а концентрация лекарственного средства в сыворотке в сутки 29 по-прежнему была выше прогнозируемой целевой

концентрации нейтрализации на основании данных *in vitro* и доклинических данных (Hansen *et al.*; Baum *et al.*; Weinrich *et al.*). Диапазон линейности разработанного анализа охватывает все клинические образцы обеих групп дозирования и шесть временных точек отбора ФК в течение одного месяца после инфузии лекарственного средства.

Пример 4. Валидация способа иммунологическим анализом

[97] Иммунологические анализы традиционно были способом отбора для определения концентрации лекарственного средства антитела в матрице сыворотки для анализа клинических образцов. Иммунологические анализы измеряют белок-мишень как интактную молекулу вместо измерения суррогатных фрагментов, полученных в результате расщепления протеазой, как в анализе ЖХ-ММР-МС. Наиболее критически важными реагентами для разработки клинического иммунологического анализа ФК являются антиидиотипические антитела, которые специфически связываются с идиотипами лекарственных средств антител, и обычно требуется несколько месяцев для скрининга и производства этих реагентов. Иммунологические анализы, как правило, обеспечивают очень хорошую чувствительность в диапазоне нг-мл, чего невозможно достичь с помощью традиционного анализа ЖХ-ММР без дополнительных этапов иммуноаффинного обогащения. Еще одним преимуществом иммунологического анализа является то, что после внедрения способа можно провести анализ большой партии анализов образцов пациентов в высокоскоростном формате.

[98] После того как электрохемилюминесцентный иммунологический анализ для REGEN-COV был полностью валидирован, клинические образцы фазы I были повторно проанализированы с помощью этого способа. Результаты сравнивали между измеренными концентрациями с помощью иммунологического анализа и с помощью способа ЖХ-ММР-МС по изобретению, как показано на ФИГ. 7. Сравнение показало, что существует хорошая согласованность между результатами обоих анализов. Различия средних концентраций лекарственного средства у отдельных пациентов ($n=15\sim 20$ на группу дозирования), измеренные с помощью двух анализов, находились в пределах 23% для мАт1 и 11% для мАт2. Этим было валидировано то, что способ ЖХ-ММР-МС по изобретению является эффективным для точного, чувствительного и специфичного измерения терапий антителом, имея при этом преимущество более быстрой разработки по

сравнению с иммунологическим анализом, который основан на реагенте антиидиотипических антител.

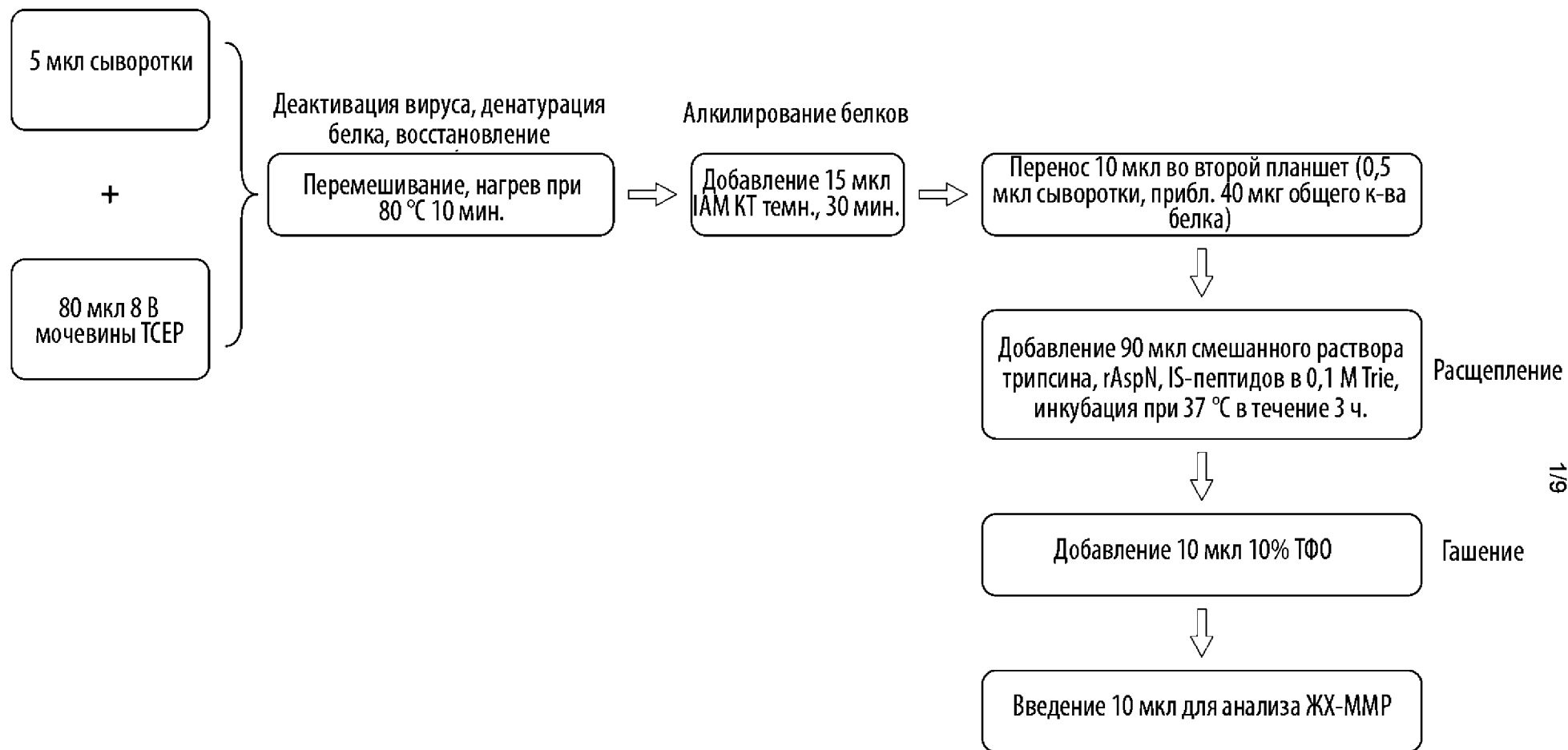
Формула изобретения

1. Способ одновременного количественного определения по меньшей мере двух терапевтических белков, включающий:
 - (a) получение образца, содержащего первый терапевтический белок и второй терапевтический белок;
 - (b) создание по меньшей мере одного уникального суррогатного пептида для каждого из указанных первого и второго терапевтических белков путем приведения указанного образца в контакт с по меньшей мере двумя расщепляющими ферментами;
 - (c) количественное определение указанных суррогатных пептидов с помощью масс-спектрометра; и
 - (d) количественное определение указанных первого и второго терапевтических белков с помощью количественно определенных суррогатных пептидов.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные расщепляющие ферменты выбраны из группы, состоящей из трипсина, химо tripsина, LysC, LysN, AspN, GluC и ArgC.
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные расщепляющие ферменты представляют собой трипсин и AspN.
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанные первый и второй терапевтические белки выбраны из группы, состоящей из антитела, моноклонального антитела, биспецифического антитела, фрагмента антитела, Fab-области антитела, конъюгата антитело-лекарственное средство или гибридного белка.
5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный первый терапевтический белок представляет собой касиривимаб, а указанный второй терапевтический белок представляет собой имдевимаб.
6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или трехквадрупольный масс-спектрометр.
7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр соединен с хроматографической системой.

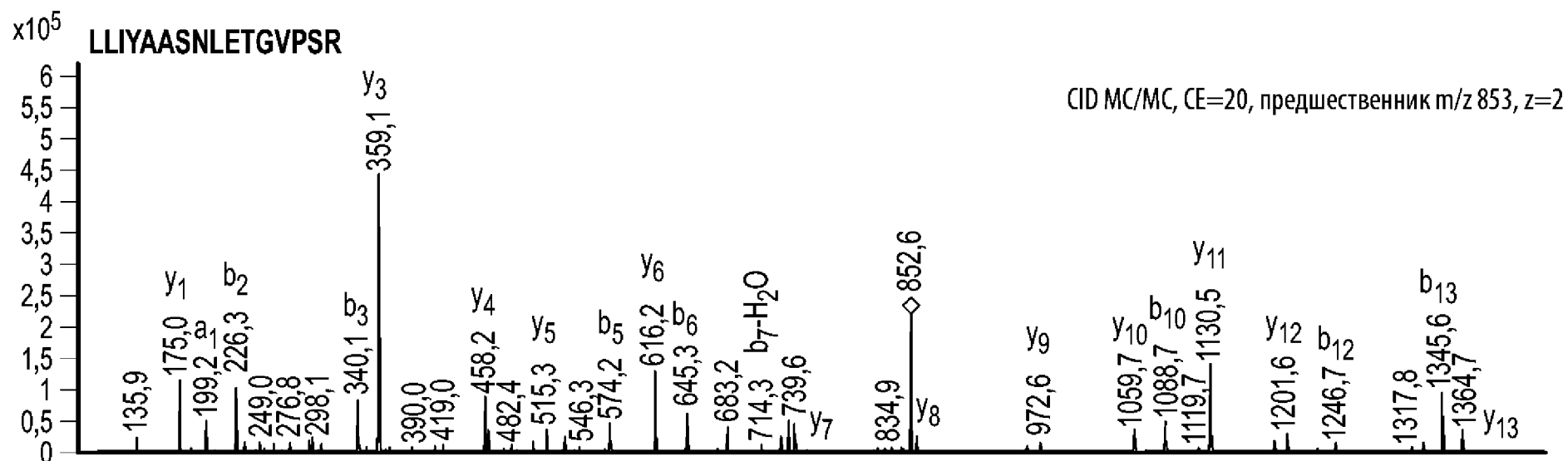
8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что указанная хроматографическая система включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматографию со смешанным режимом или их комбинацию.
9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный образец содержит сыворотку человека.
10. Способ по п. 1, дополнительно включающий отбор указанных расщепляющих ферментов с помощью анализа *in silico* потенциальных суррогатных пептидов.
11. Способ по п. 1, дополнительно включающий введение субъекту указанных первого и второго терапевтических белков.
12. Способ по п. 1, который имеет динамический диапазон от около 10 до около 2000 мкг/мл первого терапевтического белка в образце.
13. Способ по п. 1, который имеет динамический диапазон от около 10 до около 2000 мкг/мл второго терапевтического белка в образце.
14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр способен осуществлять мониторинг множественных реакций или мониторинг параллельных реакций.
15. Способ по п. 1, дополнительно включающий этапы проведения пептидного картирования указанных суррогатных пептидов, отбора уникальных пептидов и фрагментных ионов суррогатных пептидов для создания переходов мониторинга множественных реакций, отбора двух или трех верхних переходов суррогатных пептидов, оптимизации энергии соударений суррогатных пептидов, последующее создание калибровочной кривой и определение LLOQ (нижнего предела количественного определения) в соответствии с калибровочной кривой.
16. Способ по п. 1, дополнительно включающий отбор указанного по меньшей мере одного суррогатного пептида, специфичного к указанному первому или указанному второму терапевтическому белку, причем по меньшей мере один суррогатный пептид предварительно выбирают путем определения того, что:

- i. суррогатный пептид специфичен к гидролизату терапевтического белка, подлежащего количественному определению;
 - ii. суррогатный пептид конкретно отсутствует в протеазном гидролизате препарата в отсутствие по меньшей мере одного терапевтического белка;
 - iii. суррогатный пептид производит сильный сигнал при масс-спектрометрическом анализе; и
 - iv. суррогатный пептид производит различимый сигнал при масс-спектрометрическом анализе.
17. Способ одновременного количественного определения касиривимаба и имдевимаба из введенного коктейля из антител, включающий:
- (a) получение образца сыворотки, содержащего касиривимаб и имдевимаб;
 - (b) создание по меньшей мере одного уникального суррогатного пептида для каждого из касиривимаба и имдевимаба путем приведения указанного образца в контакт с трипсином и AspN;
 - (c) количественное определение указанных суррогатных пептидов с помощью масс-спектрометра; и
 - (d) количественное определение касиривимаба и имдевимаба с помощью количественно определенных суррогатных пептидов.
18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанные суррогатные пептиды содержат аминокислотные последовательности LLIYAASNLETGVPSR и DTAVYYCASGS.
19. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или трехквadrupольный масс-спектрометр.
20. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.
21. Способ по п. 17, дополнительно включающий введение субъекту касиривимаба и имдевимаба.

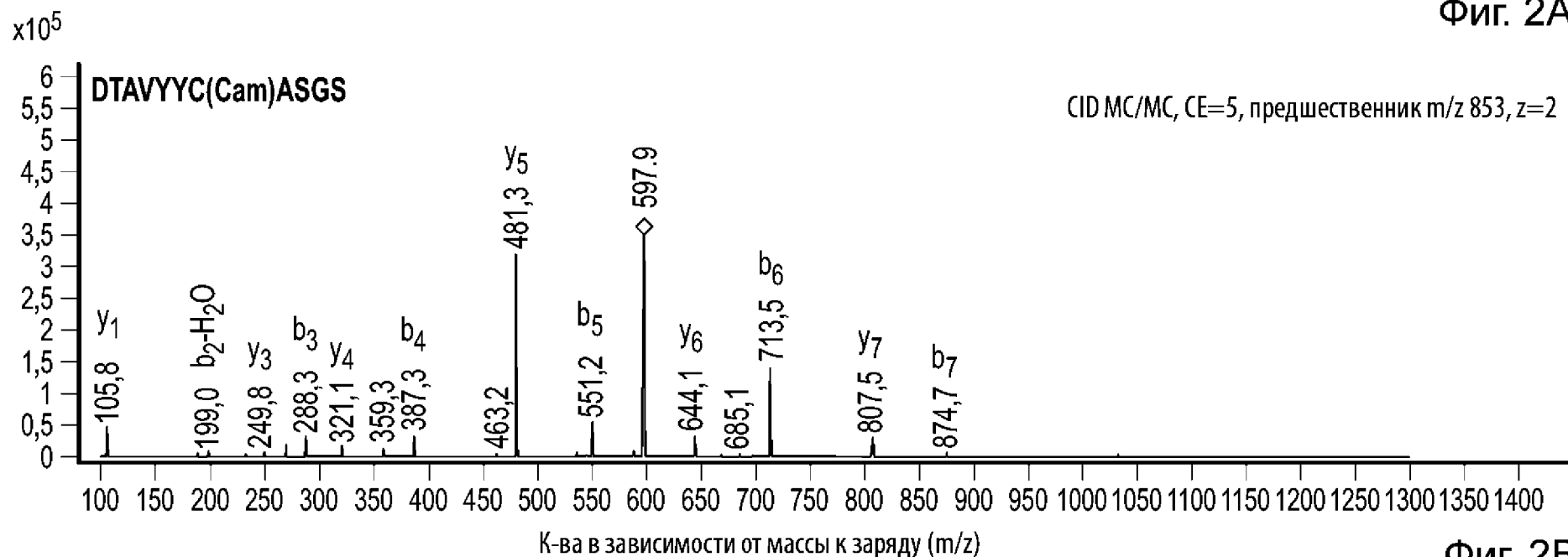
22. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр способен осуществлять мониторинг множественных реакций или мониторинг параллельных реакций.



Фиг. 1



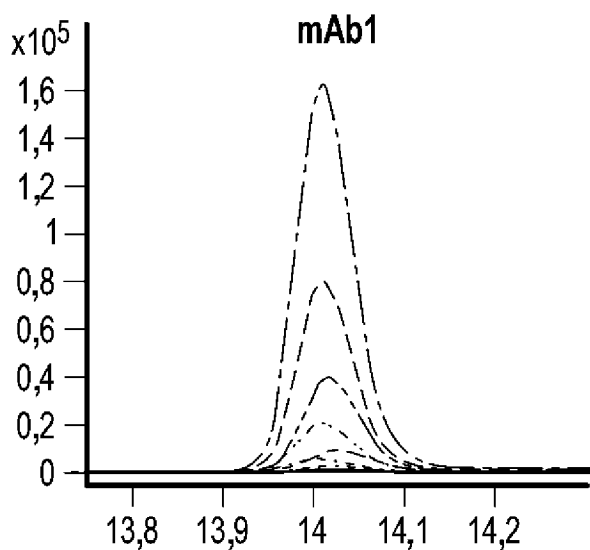
Фиг. 2А



Фиг. 2В

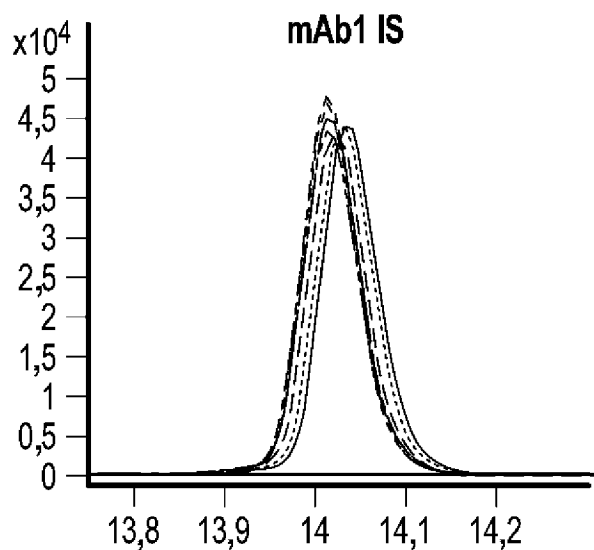
**ИЗМЕРЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, СОВМЕСТНО ВВОДИМЫХ
СУБЪЕКТУ, ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ЖХ-ММР-МС**

3/9



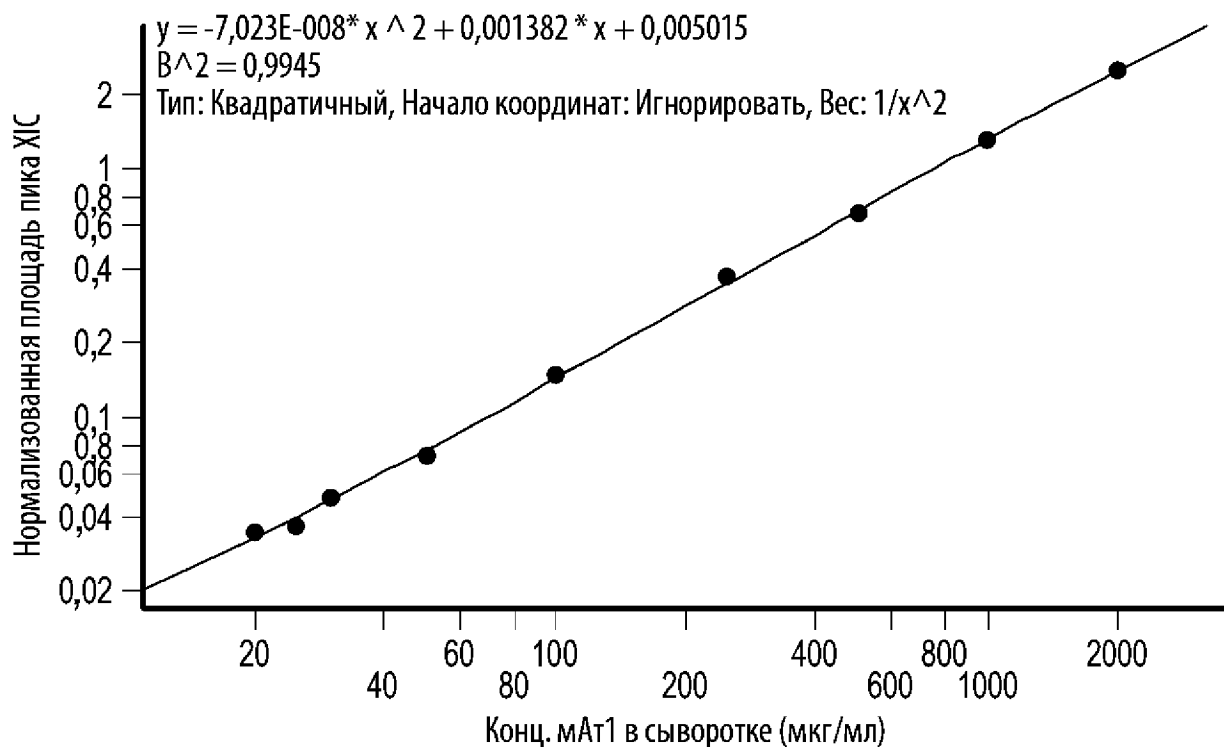
К-ва в зависимости от времени получения (мин)

Фиг. 3А



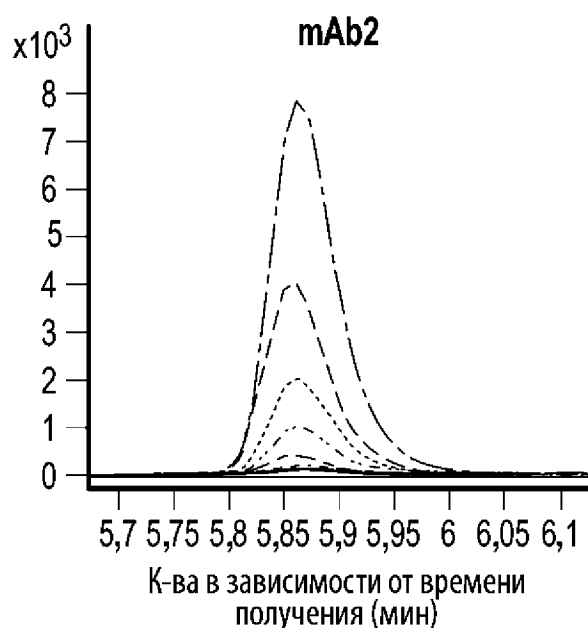
К-ва в зависимости от времени получения (мин)

Фиг. 3В

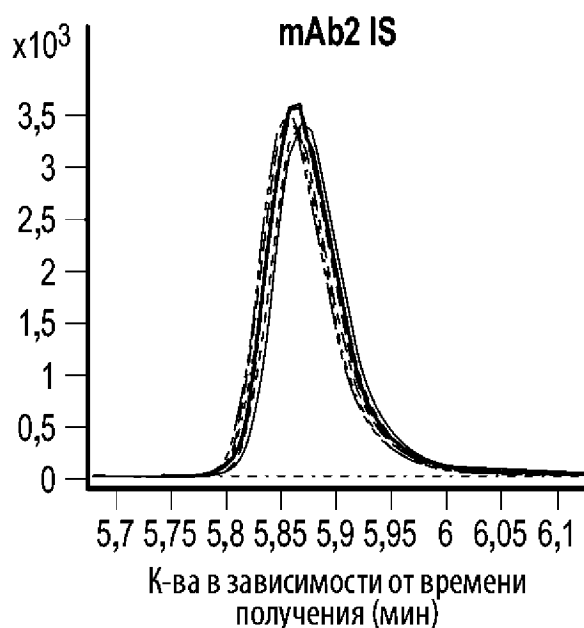


**ИЗМЕРЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, СОВМЕСТНО ВВОДИМЫХ
СУБЪЕКТУ, ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ЖХ-ММР-МС**

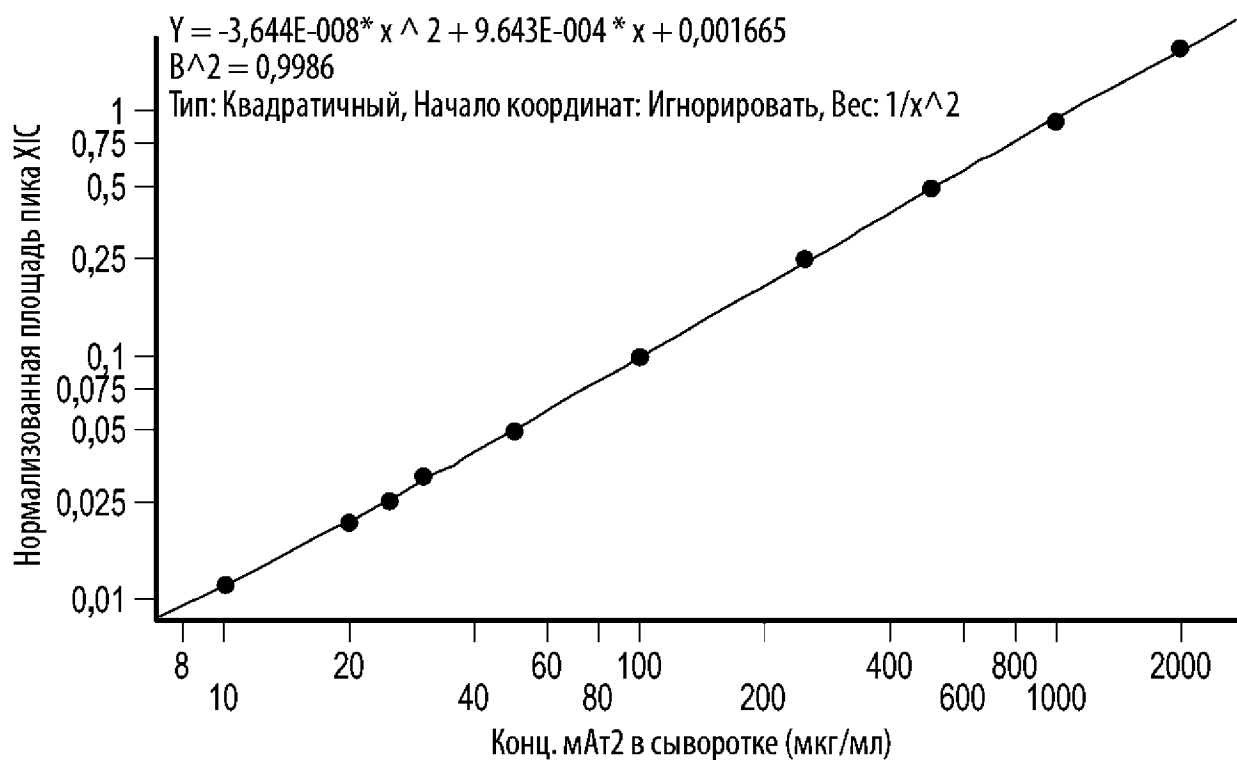
4/9



Фиг. 3D



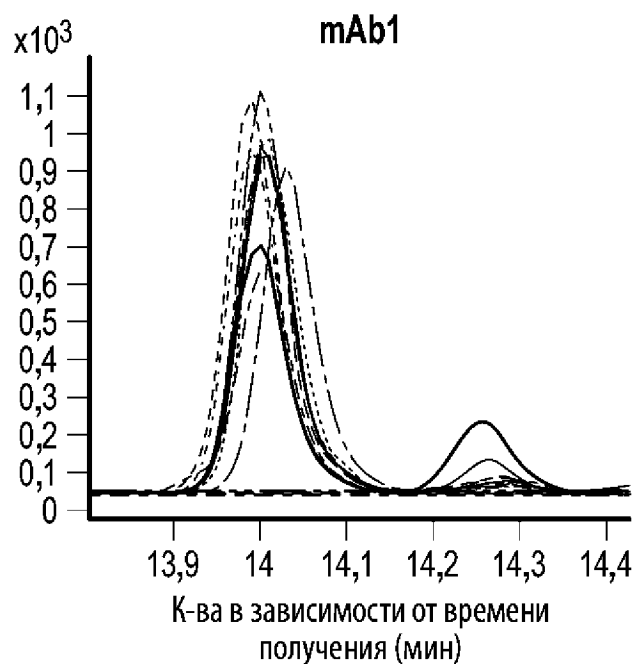
Фиг. 3E



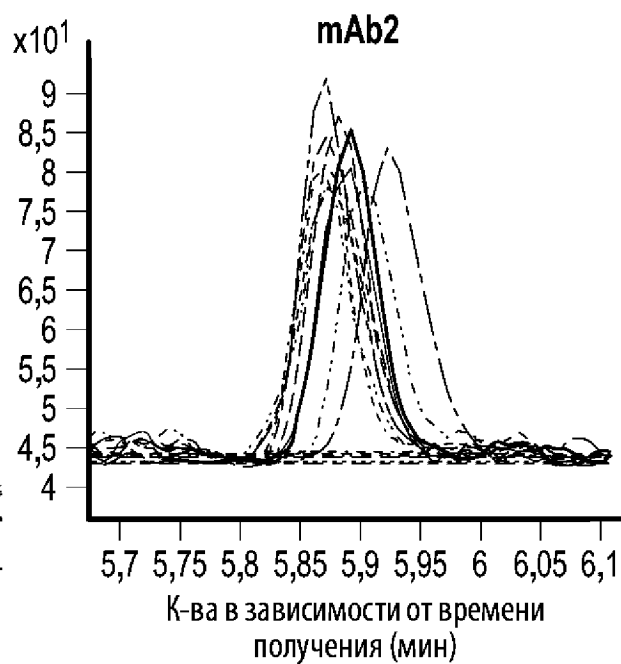
Фиг. 3F

**ИЗМЕРЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, СОВМЕСТНО ВВОДИМЫХ
СУБЪЕКТУ, ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ЖХ-ММР-МС**

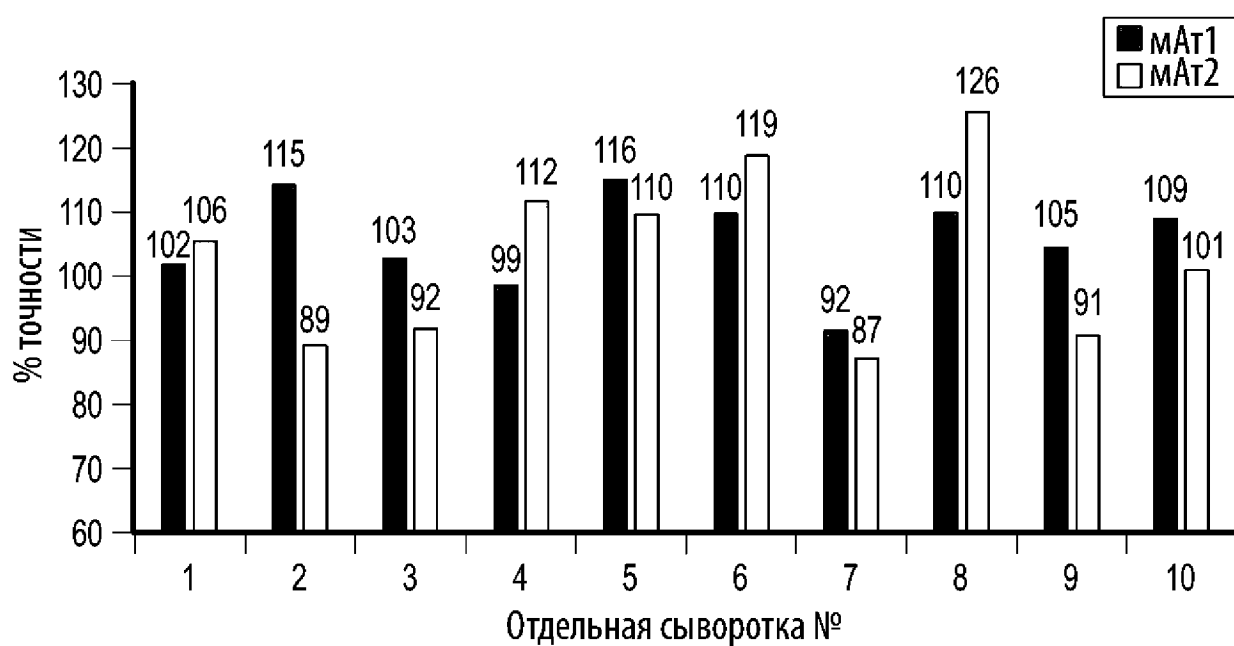
5/9



Фиг. 4А



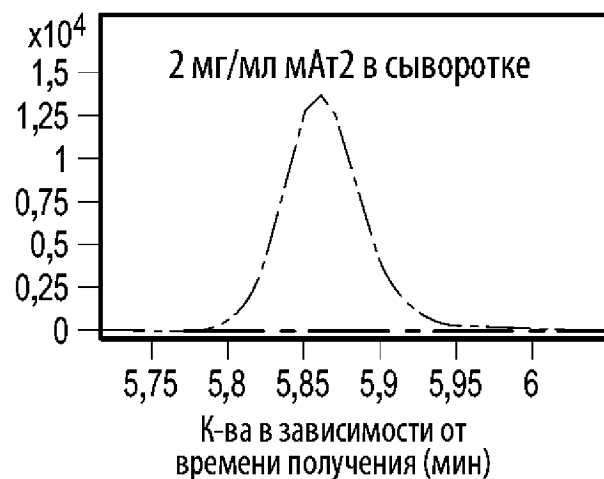
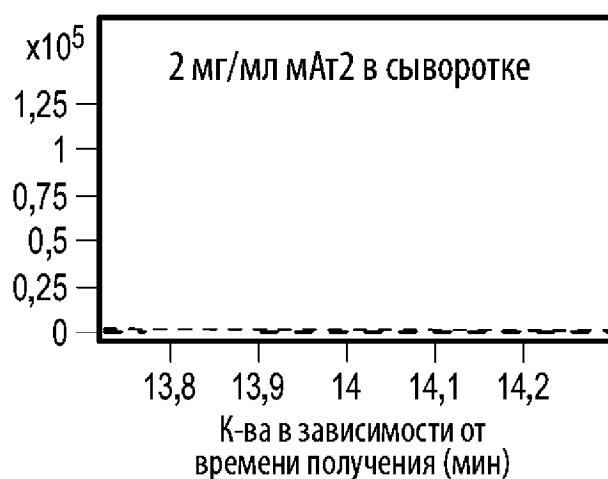
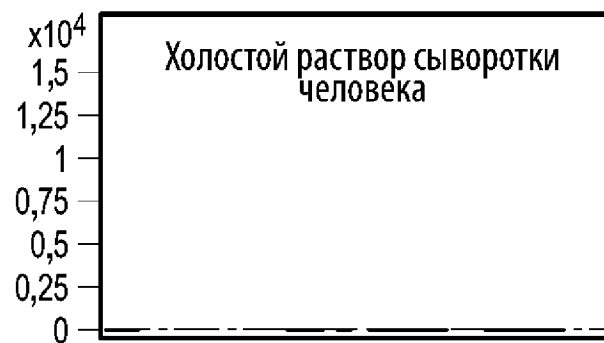
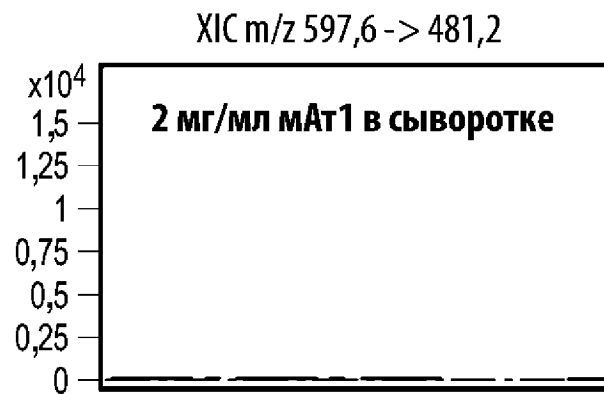
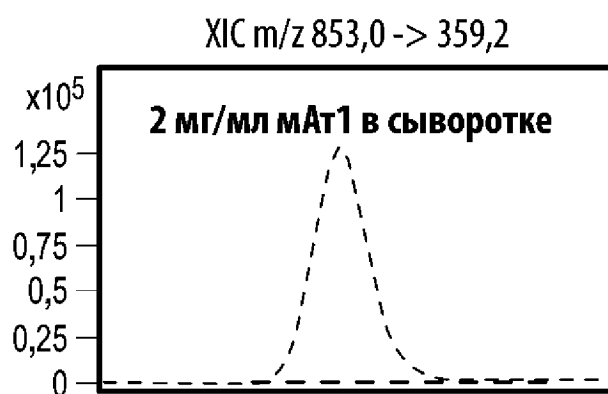
Фиг. 4В



Фиг. 4С

**ИЗМЕРЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, СОВМЕСТНО ВВОДИМЫХ
СУБЪЕКТУ, ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ЖХ-ММР-МС**

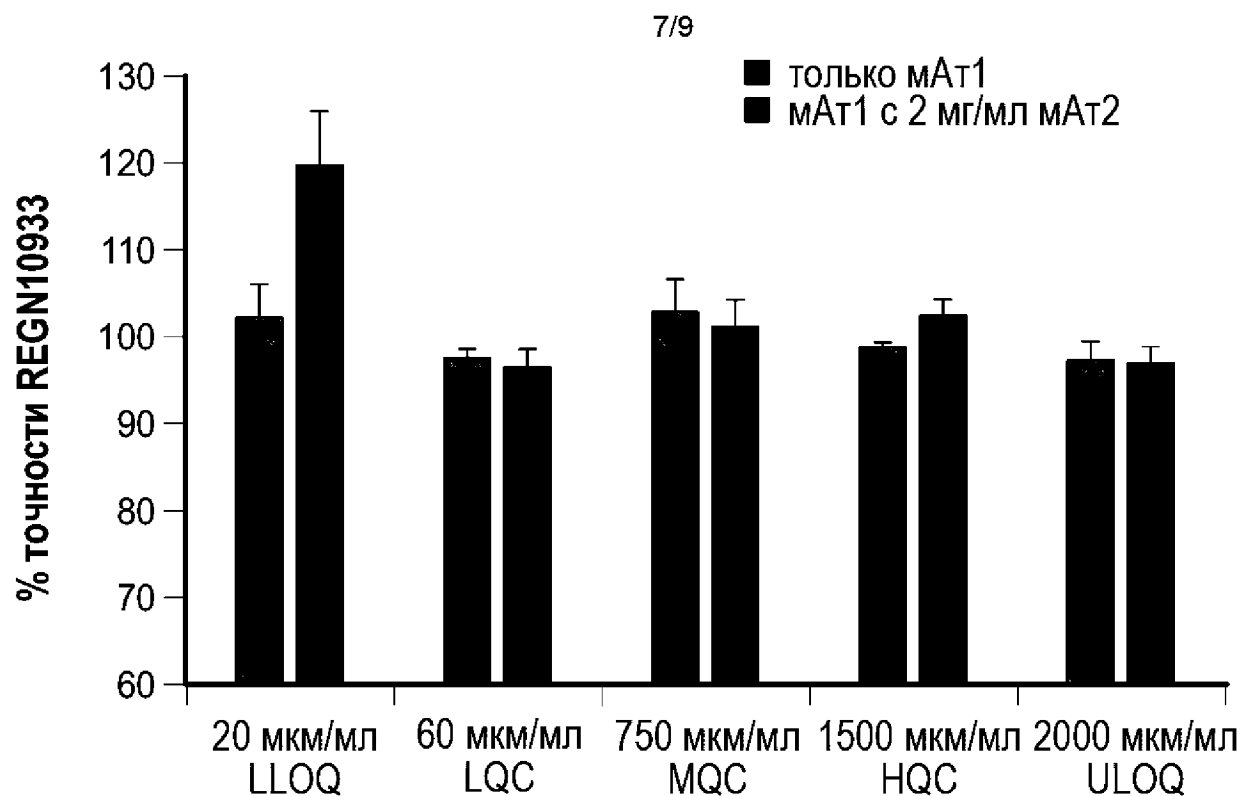
6/9



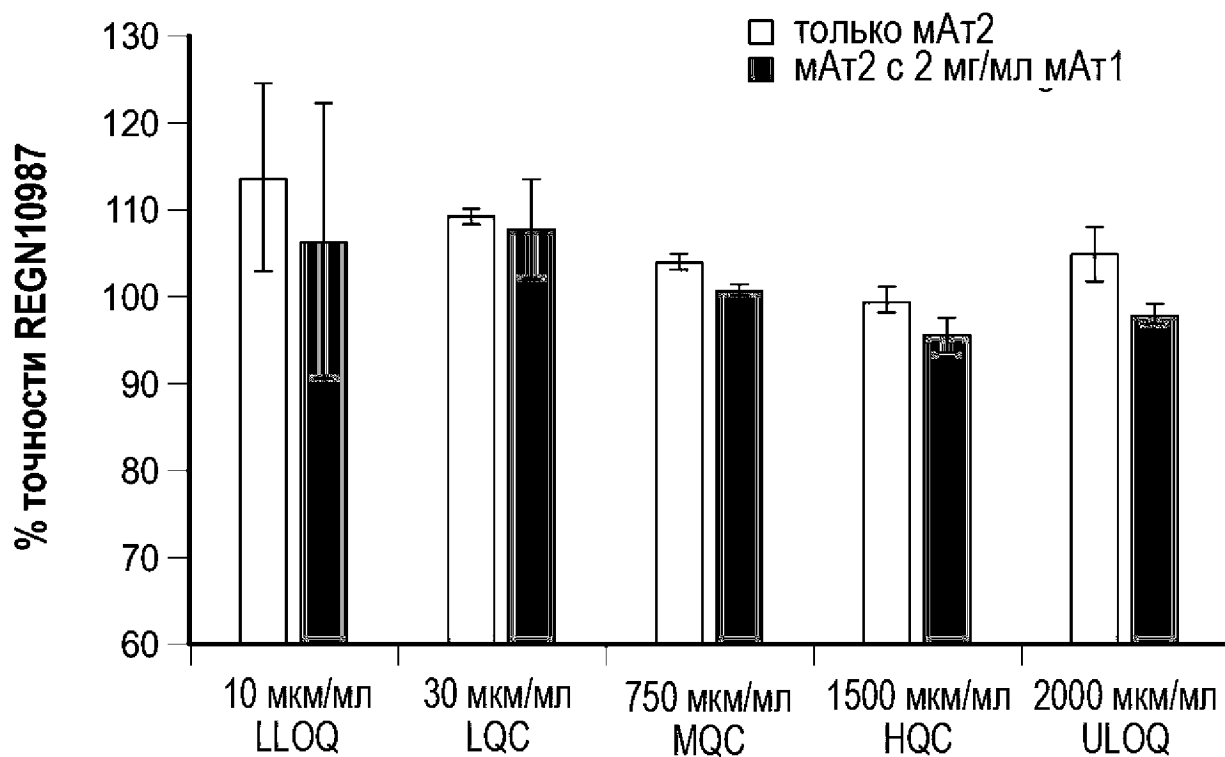
Фиг. 5А

Фиг. 5В

**ИЗМЕРЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, СОВМЕСТНО ВВОДИМЫХ
СУБЪЕКТУ, ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ЖХ-ММР-МС**



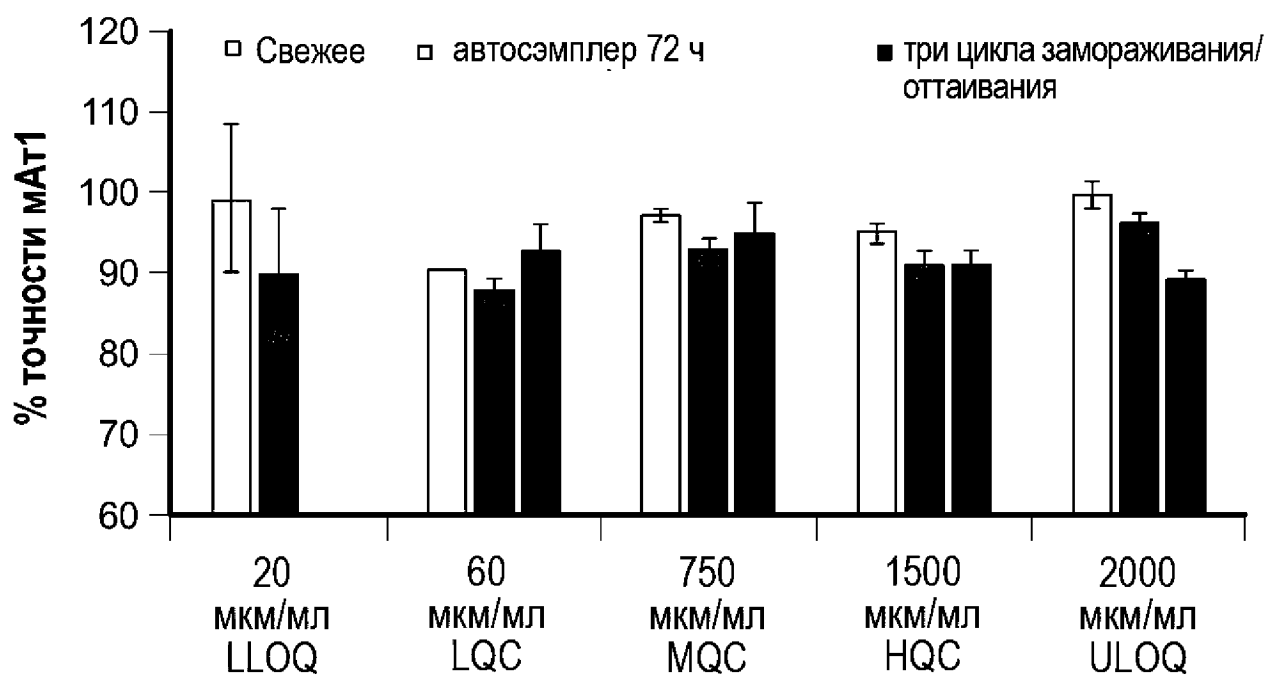
Фиг. 5С



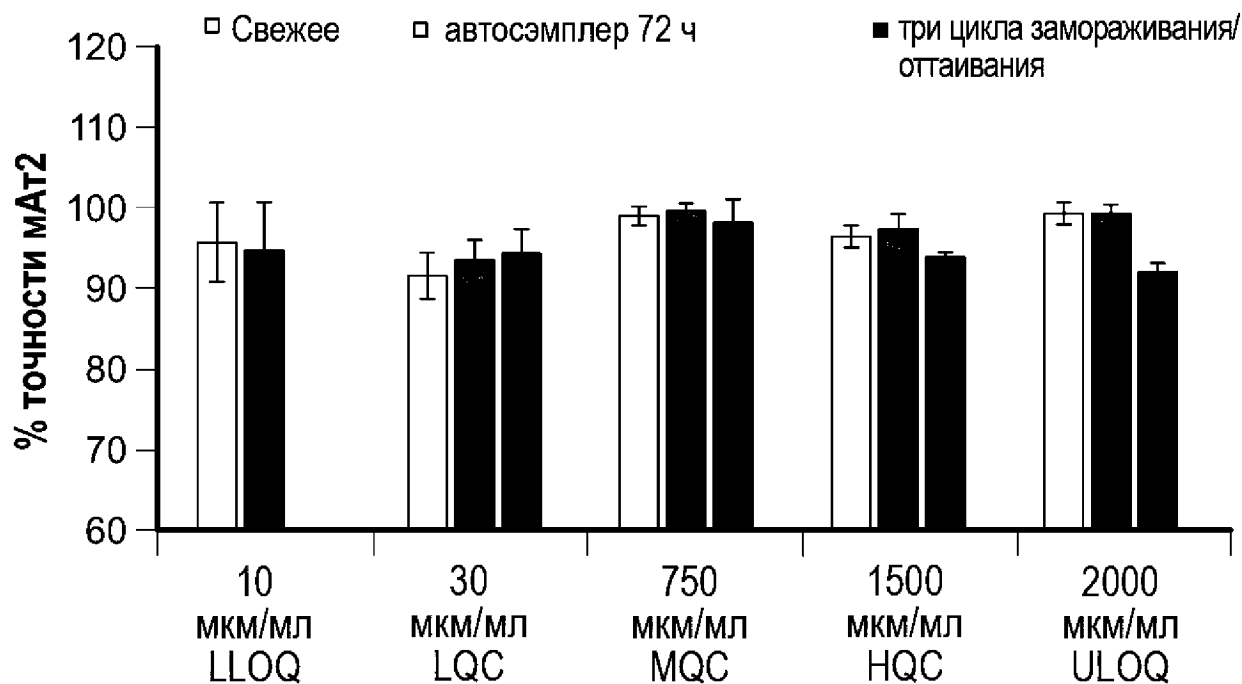
Фиг. 5D

**ИЗМЕРЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, СОВМЕСТНО ВВОДИМЫХ
СУБЪЕКТУ, ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ЖХ-ММР-МС**

8/9



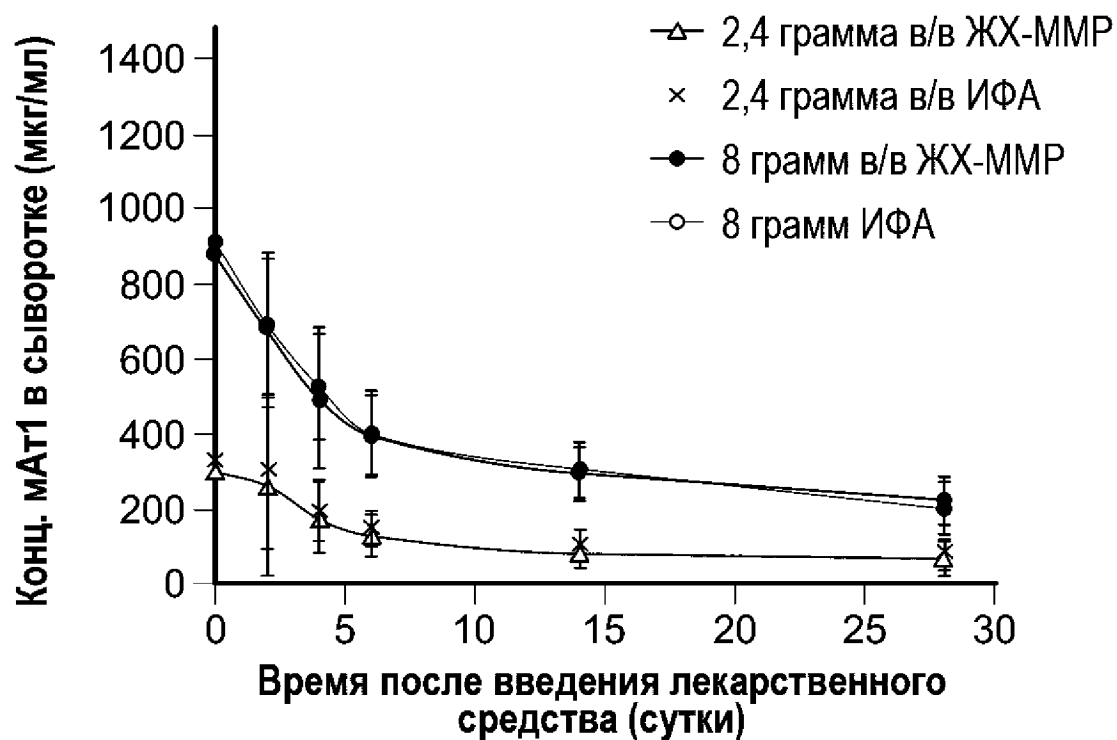
Фиг. 6А



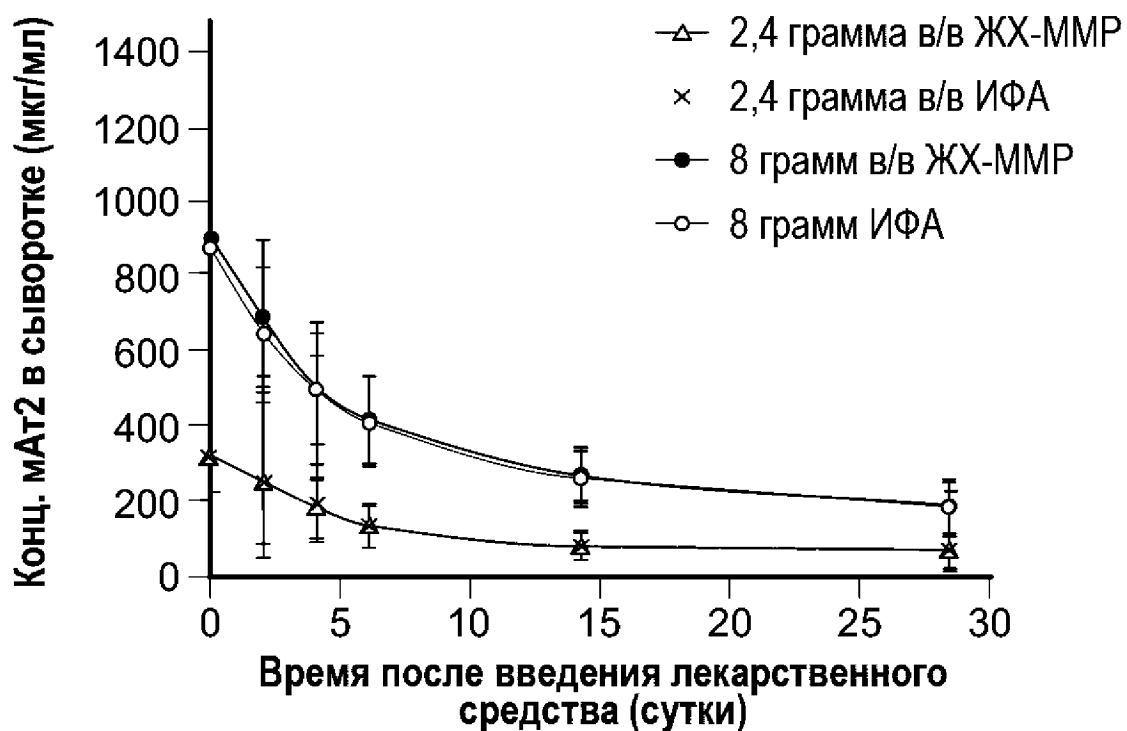
Фиг. 6В

ИЗМЕРЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ, СОВМЕСТНО ВВОДИМЫХ
СУБЪЕКТУ, ПОСРЕДСТВОМ АНАЛИЗА ЖХ-ММР-МС

9/9



Фиг. 7А



Фиг. 7В