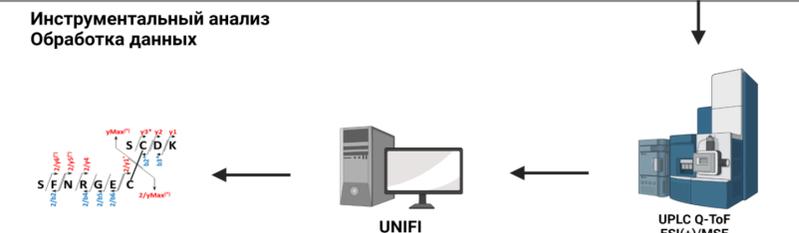
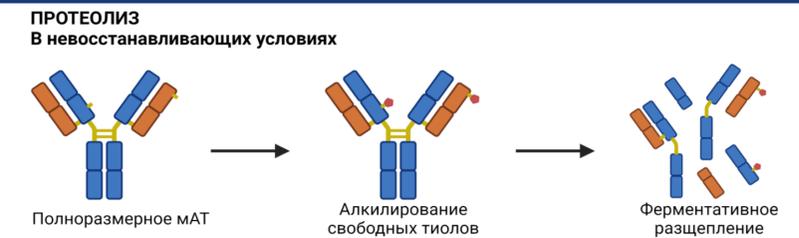


АКТУАЛЬНОСТЬ И ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Во время производства и хранения моноклональных антител (МАТ) могут возникать нежелательные модификации дисульфидов, влияющие на эффективность и безопасность конечного продукта. Дисульфидные связи антител необходимы для поддержания пространственной структуры и стабильности. Также известно, что свободные тиольные группы, отличающиеся высокой реакционной способностью, могут взаимодействовать друг с другом с образованием «ложных» дисульфидных связей (скремблирование) и агрегатов [1-5]. Модификации или перегруппировки дисульфидов могут служить причиной повышенной иммуногенности или привести к потере активности моноклонального антитела.

Цель исследования. Разработка метода ВЭЖ-МС/МСВР анализа, позволяющего надежно и воспроизводимо идентифицировать число и локализацию дисульфидных связей в препаратах МАТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

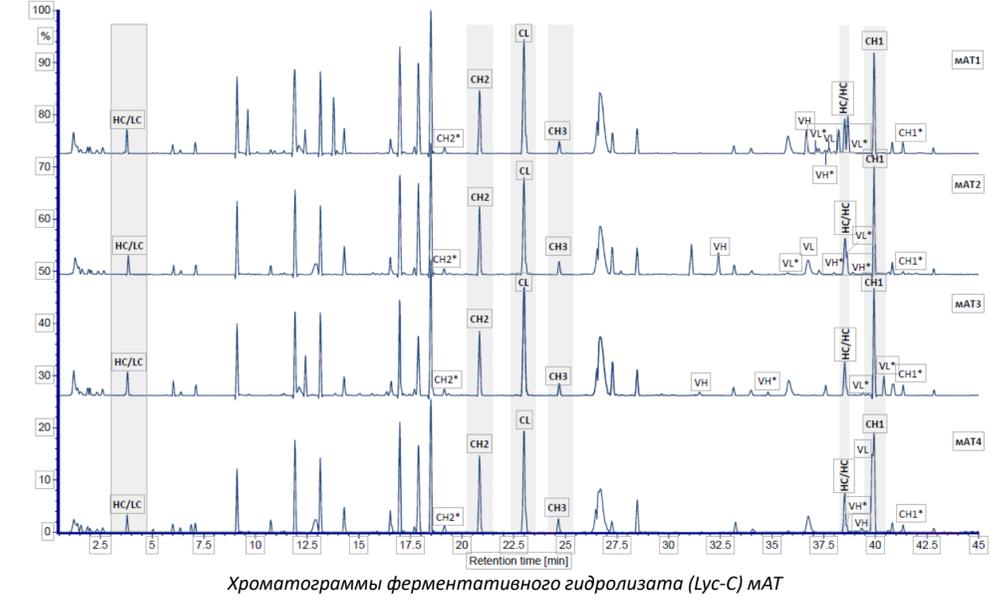
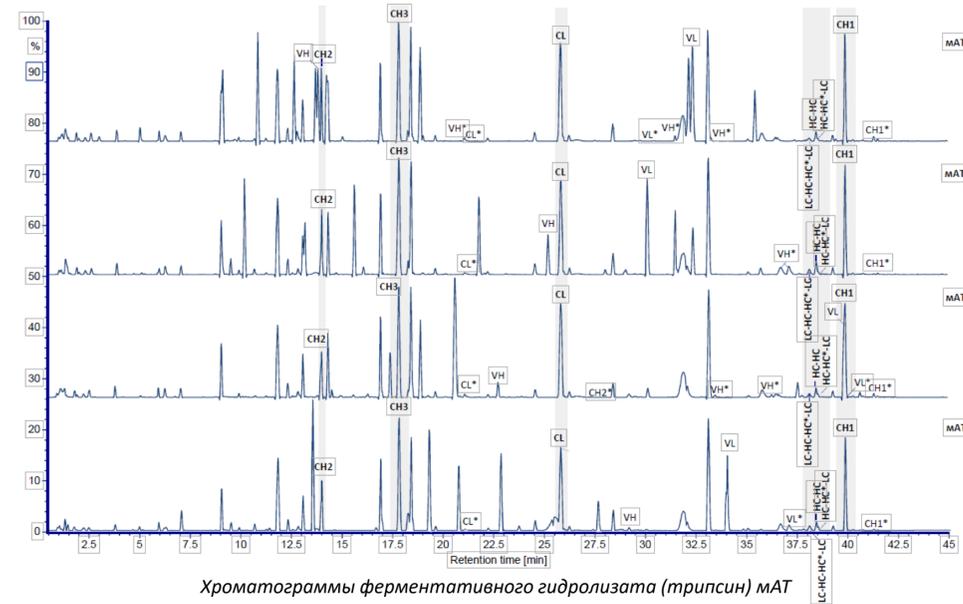


В качестве объектов исследования были выбраны коммерчески доступные МАТ (Трастузумаб, Бевацизумаб, Адалimumаб, Голимумаб), относящиеся к классу антител первого типа (IgG1). Исследуемые объекты биологических препаратов были подвергнуты ферментативному расщеплению с использованием трипсина, дополнительно были подготовлены пробы с полным восстановлением дисульфидных связей. Также МАТ были подвергнуты ферментативному расщеплению с использованием эндопротеазы Lys-C.

Инструментальный анализ проводили с использованием жидкостного хроматографа Waters Acquity UPLC с квадруполь-времяпролетным масс-спектрометрическим детектором Xevo G2-XS QTOF (Waters Corporation, США). Полученные пептидные карты обрабатывались с помощью ПО UNIFI (версия 1.8) с опцией для биофармацевтических исследований (Waters Corporation, США).

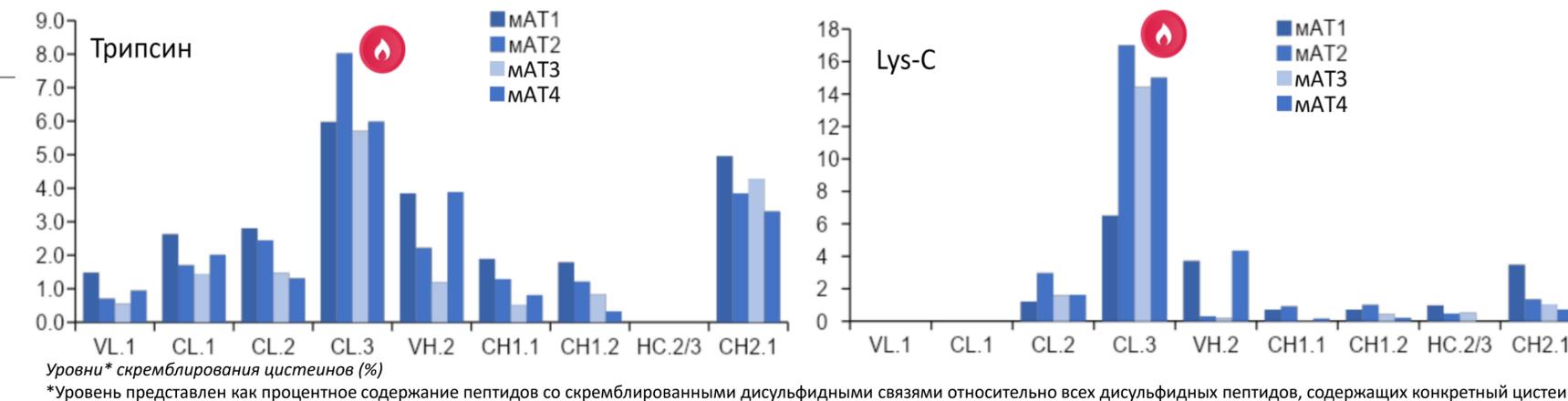
РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработан подход установления числа и локализации дисульфидных связей моноклональных антител в составе лекарственных препаратов, включающий использование двух протоколов протеолиза с использованием ферментов трипсин и эндопротеазы Lys-C.



В результате проведенной оценки эффективности метода анализа дисульфидных связей показано, что все теоретически предсказанные пептиды с дисульфидной связью могут быть идентифицированы как продукты полного или частичного гидролиза исследуемых МАТ вне зависимости от выбранного способа протеолиза.

Оценен уровень изомеризации дисульфидных связей (скремблирования). Была найдена так называемая «горячая точка» - остаток цистеина участка CL3, который в большей степени – относительно других цистеинов – вступает в реакции перегруппировки дисульфидных связей. Показано, что суммарный уровень скремблирования составляет менее 1%.



ВЫВОДЫ

Установлено, что разработанные подходы воспроизводимы в технических повторностях по относительно содержанию корректных дисульфидно-связанных пептидов. Полученные результаты демонстрируют высокую воспроизводимость методики для образцов МАТ различных партий.

Среднее стандартное отклонение относительного содержания дисульфидно-связанных пептидов не превышало 6%, за исключением некоторых минорных пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Localization and Quantitation of Free Sulfhydryl in Recombinant Monoclonal Antibodies by Differential Labeling with ¹²C and ¹³C Iodoacetic Acid and LC-MS Analysis / Tao Xiang, Chris Chumsae, and Hongcheng Liu // Anal. Chem.— 2009.— 81(19).— P. 8101–8108.
2. Disulfide bond structures of IgG molecules: structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function / MAb. —2012;4(1).— P. 17-23.
3. Characterization of antibody charge heterogeneity resolved by preparative immobilized pH gradients / Meert CD, Brady LJ, Guo A, Balland A // Anal. Chem.— 2010 May 1–82(9).— P. 3510-8.
4. Assessment of disulfide and hinge modifications in monoclonal antibodies / Moritz B, Stracke JO // Electrophoresis.— 2017 Mar. — 38(6)— P. 769-785.
5. Disulfide scrambling in IgG2 monoclonal antibodies: insights from molecular dynamics simulations / Wang X, Kumar S, Singh SK // Pharm Res.—2011 Dec.—28(12)3128-44.