

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044768**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.28

(21) Номер заявки
202091825

(22) Дата подачи заявки
2019.01.29

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)
B01D 15/18 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
G01N 30/46 (2006.01)

(54) **ДВУХКОЛОНОЧНАЯ ЖХ-МС СИСТЕМА И СПОСОБЫ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ**

(31) **62/624,352**

(32) **2018.01.31**

(33) **US**

(43) **2020.09.24**

(86) **PCT/US2019/015542**

(87) **WO 2019/152352 2019.08.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
Ванг Шунхай (US)

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

(56) **US-A1-2009145203
WO-A2-2005000226
EP-A1-1426442
WO-A2-2004017040
WO-A1-2006084045
US-A1-2008093300**

(57) Предложены способы достижения полного охвата последовательности моноклональных антител с помощью расщепления трипсином и двухколоночной системы ЖХ-МС. Способ улучшает современные методы стандартного картирования пептидов.

B1

044768

044768

B1

Область изобретения

Изобретение в целом относится к системам и способам для улучшения сиквенирования белка.

Уровень техники изобретения

Подтверждение первичной последовательности терапевтических моноклональных антител (mAb/mAb) методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) после триптического расщепления является важным анализом, обычно выполняемым в биотехнологической промышленности. Полный охват последовательности является весьма желательным для анализа пептидного картирования терапевтических моноклональных антител, но он не всегда достижим с помощью только триптического расщепления. Небольшие и/или гидрофобные пептиды с плохим удержанием или без удержания на часто используемой колонке C18 часто не обнаруживаются МС, что приводит к пробелам в карте покрытия. Это особенно проблематично, если пропущенная последовательность принадлежит критическим областям, определяющим комплементарность. Для достижения 100% покрытия часто требуется вторичное ферментативное расщепление. В качестве альтернативы, новая технология капиллярного зонального экстракционного расщепления в паре с масс-спектрометрией (КЭ-МС/СЕ-МС) может обеспечить охват 100%, но доступность таких платформ все еще ограничена.

Поэтому целью данного изобретения является предоставление систем и способов получения полных аминокислотных последовательностей белков.

Краткое описание сущности изобретения

Предложена двухколоночная система жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) и способы ее применения. В одном варианте осуществления предложена двухколоночная система жидкостной хроматографии, включающая в себя первую колонку с жидкостным соединением (fluid communication) с первым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном (multi-port switching diverter valve), вторую колонку с жидкостным соединением с первым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном; второй мультипортовый переключающийся перенаправляющий клапан в жидкостном соединении с первым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном; масс-спектрометр в жидкостном соединении со вторым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном; резервуар для сбора в жидкостном соединении со вторым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном; и компьютер в электронном соединении с двухколоночной системой хроматографии для управления потоком жидкости через систему путем конфигурирования портов первого и второго мультипортового переключающегося перенаправляющего клапана во множественные конфигурации. Указанная система может дополнительно содержать детектор, например, УФ-детектор и/или масс-спектрометр, и резервуар для сбора. Как правило, первая колонка заполнена материалом для разделения неполярных и гидрофобных пептидов, а вторая колонка заполнена материалом для разделения полярных пептидов. Например, первая колонка может быть колонкой C18, а вторая колонка может быть пористой графитовой колонкой.

В другом варианте осуществления мультипортовые переключающиеся перенаправляющие клапаны сконфигурированы с возможностью пропускания жидкой среды из первой колонки через вторую колонку. В еще одном варианте осуществления мультипортовые переключающиеся перенаправляющие клапаны выполнены с возможностью пропускания жидкости из первой колонки в обход второй колонки и протекания в масс-спектрометр.

В другом варианте осуществления предложен способ определения последовательности белка путем расщепления белка для получения пептидных фрагментов белка, загрузки пептидных фрагментов в первую высокоэффективную жидкостную хроматографическую колонку в условиях, в которых некоторые из пептидных фрагментов сохраняются на первой колонке и некоторые из пептидных фрагментов не сохраняются на первой колонке. Пептиды, не удерживаемые в первой колонке, поступают непосредственно во вторую колонку для высокоэффективной жидкостной хроматографии, при этом, по меньшей мере, часть пептидов, не удерживаемых в первой колонке, удерживается во второй колонке. Способ включает элюирование пептидов, удерживаемых в первой колонке, таким образом, что элюированные пептиды обходят вторую колонку. Элюированные пептиды анализируют масс-спектрометрией для определения аминокислотной последовательности пептидов. Пептиды из второй колонки также элюируют и анализируют масс-спектрометрией для определения аминокислотной последовательности элюированных пептидов. Комбинированные последовательности элюированных пептидов из первой и второй колонок обеспечивают полную аминокислотную последовательность белка. В одном варианте осуществления сиквенируемый белок представляет собой антитело, например моноклональное антитело или слитый белок.

В другом варианте осуществления первая колонка заполнена материалом для разделения неполярных пептидов, а вторая колонка заполнена материалом для разделения полярных пептидов. Например, первая колонка может представлять собой колонку C18, а вторая колонка может представлять собой пористую графитовую колонку. В определенных вариантах осуществления белок восстанавливается и алкилируется перед расщеплением. Белки обычно ферментативно расщепляются, например, с использованием трипсина.

В одном варианте осуществления пептиды, элюированные с колонки C18, анализируют масс-спектрометрией в диапазоне сканирования от 300 до 2000 м/з, а пептиды, элюированные с колонки PGC,

анализируют масс-спектрометрией в диапазоне сканирования от 200 до 2000 м/з.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой схему иллюстративной двухколоночной системы ЖХ-МС.

Фиг. 2А-2С представляют собой схематические диаграммы конфигурации сдвоенных перенаправляющих клапанов. Линии указывают путь потока растворителя, когда перенаправляющие клапаны настроены в режимах "Загрузка", "Элюция С18" или "Элюция PGC". Положение "1-х/1-х" относится к положениям портов перенаправляющих клапанов 1 и 2 соответственно.

Фиг. 3 - изображение пользовательского интерфейса, демонстрирующее иллюстративную настройку способа масс-спектрометра для сбора данных для двухколоночной конфигурации PGC-C18.

Фиг. 4 представляет собой таблицу, демонстрирующую репрезентативный пример градиента элюции С18-PGC.

На фиг. 5А и 5В представлены фотографии первого мультипортового переключающегося перенаправляющего клапана, расположенного над вторым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном.

Фиг. 6А - снимок экрана пользовательского интерфейса, демонстрирующий параметры для элюции С18. Фиг. 6В - снимок экрана пользовательского интерфейса, демонстрирующий параметры для элюции PGC.

Фиг. 7А, В представляют собой иллюстративную общую ионную хроматограмму (ТИС) анализа картирования пептидов С18-PGC.

Подробное описание сущности изобретения

Определения.

Используемый в данном документе термин "пептидное картирование" относится к методике характеристики белков и выяснения их первичных аминокислотных структур. Это широко используемый метод для характеристики моноклональных антител и других фармацевтических препаратов на основе рекомбинантных белков.

Используемый в данном документе термин "триптические пептиды" относится к пептидам, которые генерируются путем переваривания более крупных белков в более мелкие пептиды с использованием сериновой протеазы трипсина. Трипсин расщепляет белки на пептиды со средним размером от 700 до 1500 Дальтон путем гидролиза пептидных связей на карбоксиконцевой стороне аминокислотных остатков аргинина и лизина.

Используемый в данном документе термин "колодка из пористого графитового углерода (PGC)" относится к колодке для хроматографии, которая состоит из пористого графитового углерода. Это хорошая стационарная фаза в жидкостной хроматографии из-за уникального удержания и разделения очень полярных соединений.

Используемый в данном документе термин "колодка С18" относится к колодке для хроматографии с обращенной фазой, обычно используемой в жидкостной хроматографии. Колодки С18 состоят из углеродных цепей, связанных с частицами кремнезема внутри колодки. Эти колодки обычно используются для разделения гидрофобных и неполярных молекул, которые связываются с углеродными цепями кремнезема.

Используемый в данном документе термин "жидкостная хроматография (ЖХ)" относится к методике, используемой для разделения, идентификации и количественного определения компонентов в смеси. В колоночной жидкостной хроматографии жидкая подвижная фаза проходит через колодку, и компоненты подвижной фазы взаимодействуют с твердой стационарной фазой. Состав подвижной фазы может быть изменен во время цикла разделения для изменения силы взаимодействия интересующих соединений. Поскольку подвижная фаза продолжает течь через колодку, элюент обычно собирают фракциями, следя за концентрациями соединений, элюируемых с колодки, с течением времени, чтобы получить кривную элюции или хроматограмму.

Жидкостная хроматография обычно сочетается с масс-спектрометрией для непрерывного измерения элюции белка с колодки путем измерения поглощения света при 280 нм аминокислотой триптофаном. Каждый отдельный пик на хроматограмме представляет собой уникальный компонент, разделенный колодкой, а площадь под пиком соответствует количеству этого соединения, элюированного с колодки. Один пик может содержать несколько белков, поэтому часто требуется дальнейший анализ элюированных фракций.

Используемый в данном документе термин "стационарная фаза" относится к веществу, которое остается фиксированным в колодке. Наиболее часто используемые колодки с неподвижной фазой представляют собой диоксид кремния с углеродной цепью, диоксид кремния с фенильной связью и диоксид кремния с циано-связью.

Как используется в данном документе, "подвижная фаза" и "жидкая фаза" могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к смесям воды или водных буферов и органических растворителей, которые используются для элюции соединений из колонок. Наиболее распространенные растворители для подвижной фазы включают, но не ограничиваются ими, ацетонитрил, метанол, трет-гидрофуран, этанол или изопропиловый спирт.

Используемый в данном документе термин "элюция", "элюировать" и "элюированный" относится к процессу извлечения одного материала из другого путем промывания растворителем.

Используемый в данном документе термин "общая ионная хроматограмма (ГИС)" представляет собой тип хроматограммы, созданный суммированием интенсивностей всех масс-спектральных пиков, принадлежащих одному и тому же сканированию. ГИС включает в себя фоновый шум, а также образцы компонентов.

Используемый в данном документе термин "TFA" является аббревиатурой от трифторуксусной кислоты, обычно используемого модификатора для разделения пептидов в жидкостной хроматографии с обращенной фазой. Модификаторы - это вещества, добавляемые в подвижную фазу, которые взаимодействуют как с неподвижной фазой, так и с образцом, чтобы изменить удержание.

Термин "ЖХ-МС" относится к методике аналитической химии, которая объединяет возможности физического разделения жидкостной хроматографии (или ВЭЖХ) с возможностями масс-анализа масс-спектрометрии (МС).

Двухколоночная система ЖХ-МС.

В стандартной конфигурации картирования пептидов пептиды удерживаются на колонке C18, установленной в системе ЖХ, и элюируются на масс-спектрометр с помощью одного 6-портового переключаемого клапана, который переключается между прямым потоком ЖХ на масс-спектрометр или в резервуар для отходов.

Один вариант осуществления обеспечивает двухколоночную систему жидкостной хроматографии, включающую в себя первую колонку, сообщающуюся с помощью жидкого соединения с первым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном; вторую колонку, сообщающуюся с помощью жидкого соединения с первым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном; второй мультипортовый переключающийся перенаправляющий клапан, который сообщается с помощью жидкого соединения с первым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном; масс-спектрометр, который сообщается с помощью жидкого соединения со вторым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном; резервуар для сбора, который сообщается с помощью жидкого соединения со вторым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном; и компьютер в электронной связи с двухколоночной системой хроматографии для управления потоком жидкости через указанную систему путем конфигурирования портов первого и второго мультипортовых переключающихся перенаправляющих клапанов в множественных конфигурациях.

Система может дополнительно включать детектор, например УФ детектор и/или масс-спектрометр, и резервуар для сбора. Обычно первая колонка заполнена материалом для разделения неполярных пептидов, а вторая колонка заполнена материалом для разделения полярных пептидов. Например, первая колонка может быть колонкой C18, а вторая колонка может быть пористой графитовой колонкой.

В другом варианте осуществления мультипортовые переключающиеся перенаправляющие клапаны выполнены с возможностью пропускания жидкой среды из первой колонки через вторую колонку. В еще одном варианте осуществления мультипортовые переключающиеся перенаправляющие клапаны сконфигурированы так, чтобы позволить жидкости из первой колонки обходить вторую колонку и течь к масс-спектрометру.

Фиг. 1 представляет собой схему иллюстративной системы 100. Система 100 содержит колонку 101. Колонка 101 обычно представляет собой колонку ВЭЖХ, заполненную материалом для разделения неполярных и/или гидрофобных пептидов. Колонка 101 сообщается с помощью жидкого соединения с мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном 103. Система 100 также включает в себя вторую колонку 102, также сообщающуюся с помощью жидкого соединения с мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном 103. Мультипорт 103 находится в гидравлическом сообщении со вторым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном 104. Мультипортовый переключающийся перенаправляющий клапан 104 сообщается с помощью жидкого соединения с масс-спектрометром 106 и резервуаром для сбора 105.

Сдвоенные перенаправляющие клапаны.

Иллюстративная конфигурация двух переключающихся перенаправляющих клапанов продемонстрирована на фиг. 2А-2С. На фиг. 5А и 5В представлены фотографии иллюстративных сдвоенных перенаправляющих клапанов. Первое положение перенаправляющего клапана называется "1-6", в котором поток растворителя входит через порт 1 и выходит через порт 6. Второе положение перенаправляющего клапана - "1-2", в котором поток растворителя поступает через порт 1 и выходит через порт 2. Положение "1-х/1-х" относится к положениям портов перенаправляющих клапанов 1 и 2 соответственно. Поэтому, например, "1-6/1-6" указывает, что растворитель из ЖХ поступает в порт 1 и выходит из порта 6 перенаправляющего клапана 1, затем входит в порт 1 и выходит из порта 6 перенаправляющего клапана 2. Первый перенаправляющий клапан установлен так, что положение "1-6" направит поток от ЖХ через колонку PGC во вход второго перенаправляющего клапана. Соединения с колонкой PGC расположены в портах 6 и 3 перенаправляющего клапана 1, как продемонстрировано на фиг. 2А. Более конкретно, выходная линия от ЖХ соединена с портом 1 перенаправляющего клапана 1, колонка PGC присоединена в портах 3 и 6 с направлением потока от порта 6 к порту 3, и выходная линия от порта 2 перенаправляющего кла-

пана 1, которая подключена к порту 1 отводного клапана 2. Второй перенаправляющий клапан установлен так, что положение "1-6" направляет поток из выпускного порта перенаправляющего клапана 1 в масс-спектрометр, а положение "1-2" перенаправляет поток в отходы. Более конкретно, выход перенаправляющего клапана 1 соединен с портом 1, выход перенаправляющего клапана 2 соединяет порт 2 с масс-спектрометром, и какой-либо выход соединяет порт 6 с резервуаром для отходов. Пептиды могут быть загружены как на колонку C18, так и на колонку PGC в "1-6/1-6" позиции.

Элюирование триптических пептидов с колонки C18 будет происходить в положении "1-2/1-2", как описано на фиг. 2В. Элюирование пептидов с колонки PGC будет происходить в положении "1-6/1-2", как описано на фиг. 2С.

В одном варианте осуществления скорость потока через двухколоночную систему ЖХ-МС может составлять 0,25 мл/мин. Специалисту в данной области будет понятно, что в раскрытых системах могут использоваться другие скорости потока, используемые в типичных ЖХ-МС.

В одном варианте осуществления подвижная фаза представляет собой 0,05% TFA в воде для загрузки и 0,045% TFA в ацетонитриле для фазы элюции. Типичный градиент элюции продемонстрирован на фиг. 4.

В одном варианте осуществления для загрузки использовали 0,1% муравьиную кислоту (FA), а для элюции использовали 0,1% муравьиную кислоту в ацетонитриле.

Переключением положений перенаправляющего клапана можно управлять в настройках масс-спектрометра, как продемонстрировано на фиг. 3. Время переключения переключателей коррелирует с градиентом ЖХ C18-PGC, пример которого продемонстрирован на фиг. 3

Элюция пептидов.

В одном варианте осуществления белки сиквенируют с использованием двухколоночной системы ЖХ-МС, раскрытой в данном документе. Белки обычно восстанавливают и алкилируют, используя TCEP и йодацетамид, а затем расщепляют трипсином для получения триптических пептидов. Загрузка и элюирование триптических пептидов с колонки C18 и колонки PGC могут быть достигнуты последовательно. Например, смеси после обработки трипсином вводят в ЖХ-МС и затем загружают в колонки C18 и PGC с перенаправляющими клапанами в положении "1-6/1-6". Триптические пептиды сначала сохраняются в колонке C18. Гидрофильные пептиды, которые не удерживаются в колонке C18, затем элюируются в колонку PGC ниже и остаются в колонке PGC. Фиг. 6А и 6В демонстрируют примерные параметры элюции. После этапа загрузки в колонке C18 сначала происходит элюирование пептидов, при этом перенаправляющие клапаны устанавливаются так, чтобы обходить колонку PGC с использованием положения "1-2/1-2". После завершения элюции на колонке C18 градиент уравнивается до начальных условий. Элюция колонки PGC происходит путем отвода потока через колонку PGC с помощью перенаправляющих клапанов в положении "1-6/1-2". Элюция C18 должна происходить во время обхода нижерасположенной колонки PGC, чтобы избежать засорения колонки PGC более крупными триптическими пептидами, оставшимися на колонке C18, или сигналом помех небольших гидрофильных пептидов, оставшихся на колонке PGC.

Масс-спектрометрический анализ.

Пептидный элюат из колонок C18 и PGC поступает в масс-спектрометр для МС анализа. В одном варианте осуществления диапазон сканирования для элюента C18 установлен от 300 до 2000 м/з для поддержания нормального исходного уровня TIC. В одном варианте осуществления диапазон сканирования для элюата PGC установлен от 200 до 2000 м/з, чтобы обнаружить маленькие пептиды. Было продемонстрировано, что раскрытые способы обеспечивают 100% охват последовательности для всех протестированных молекул.

Двухколоночная система ЖХ-МС может быть реализована с небольшими модификациями в существующих схемах картирования пептидов C18, обеспечивая при этом больший охват последовательности и ценную информацию. Следовательно, двухколоночная система ЖХ-МС предлагает простое решение для достижения полного охвата последовательностей мАт в одном анализе ЖХ-МС.

Примеры

Пример 1. Анализ охвата последовательности.

Способы.

Образцы моноклональных антител сначала восстанавливали и алкилировали с использованием TCEP и йодацетамида перед расщеплением трипсином. Затем смеси для расщепления впрыскивали в двухколоночную систему ЖХ-МС, состоящую с колонки C18 и колонки PGC. Во время стадии загрузки триптические пептиды сначала удерживались на колонке C18. Гидрофильные пептиды, не удерживаемые в этой колонке, элюировали и удерживали в нижерасположенной колонке PGC. Элюция сначала происходила в колонке C18, в то время как перенаправляющий клапан позволял потоку обходить колонку PGC. После завершения элюции на колонке C18 и уравнивания градиента до начальных условий, элюцию пептидов на колонке PGC начинали с отвода потока через колонку PGC.

Результаты.

Наблюдалось, что обычные пептиды, остающиеся на колонке PGC, но не на колонке C18, были дипептидами, содержащими C-концевой Lys или Arg. Используя точные массы МС1 и характерные при-

знаки ионов аммония во время HCD фрагментации, можно с уверенностью подтвердить идентичность этих коротких пептидов. Используя эталонный стандарт NIST NIST mAh и несколько собственных молекул NIST mAh, было продемонстрировано, что раскрытый способ может обеспечить 100% охват последовательности для всех протестированных молекул. Фиг. 7 демонстрирует общую ионную хроматограмму иллюстративного белка, который был сиквенирован.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения последовательности белка, включающий:
 - расщепление белка для получения пептидных фрагментов;
 - загрузку пептидных фрагментов в первую колонку для высокоэффективной жидкостной хроматографии в условиях, в которых некоторые из пептидных фрагментов сохраняются в первой колонке, а некоторые из пептидных фрагментов не сохраняются в первой колонке, при этом пептиды, которые не сохраняются в первой колонке текут непосредственно во вторую колонку для высокоэффективной жидкостной хроматографии, при этом, по меньшей мере, часть пептидов, не оставшихся в первой колонке, остается во второй колонке;
 - элюирование пептидов, удерживаемых в первой колонке, причем элюированные пептиды обходят вторую колонку, и анализ элюированных пептидов с помощью масс-спектрометрии для определения аминокислотной последовательности пептидов;
 - и элюирование пептидов из второй колонки и анализ элюированных пептидов с помощью масс-спектрометрии для определения аминокислотной последовательности элюированных пептидов, при этом комбинированные последовательности элюированных пептидов из первой и второй колонок дают полную аминокислотную последовательность белка.
2. Способ по п.1, в котором белок представляет собой антитело или слитый белок.
3. Способ по п.2, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело.
4. Способ по любому из пп.1-3, в котором первая колонка заполнена материалом для отделения неполярных пептидов, а вторая колонка заполнена материалом для отделения полярных пептидов.
5. Способ по любому из пп.1-4, в котором первая колонка представляет собой колонку C18.
6. Способ по любому из пп.1-5, в котором вторая колонка представляет собой пористую графитовую колонку.
7. Способ по любому из пп.1-6, в котором белок восстанавливают и алкилируют перед расщеплением.
8. Способ по любому из пп.1-7, в котором белок расщепляют трипсином.
9. Способ по п.5, в котором пептид, элюированный с колонки C18, анализируют масс-спектрометрией в диапазоне сканирования от 300 до 2000 м/з.
10. Способ по п.6, в котором пептиды, элюированные с колонки PGC, анализируют масс-спектрометрией в диапазоне сканирования от 200 до 2000 м/з.
11. Двухколоночная система жидкостной хроматографии для определения аминокислотной последовательности белка, содержащая:
 - первую колонку для высокоэффективной жидкостной хроматографии, сообщающуюся с помощью жидкого соединения с первым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном, где в первую колонку загружают пептидные фрагменты;
 - вторую колонку для высокоэффективной жидкостной хроматографии, сообщающуюся с помощью жидкого соединения с первым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном, где часть пептидных фрагментов, не удерживаемых в первой колонке, поступает непосредственно во вторую колонку, и удерживаются в ней, и при этом осуществляют элюирование пептидных фрагментов, удерживаемых в первой колонке и пептидных фрагментов, удерживаемых во второй колонке;
 - второй мультипортовый переключающийся перенаправляющий клапан, сообщающийся с помощью жидкого соединения с первым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном;
 - масс-спектрометр, сообщающийся с помощью жидкого соединения со вторым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном;
 - резервуар для сбора, сообщающийся с помощью жидкого соединения со вторым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном, где элюированные пептидные фрагменты из первой колонки и элюированные пептидные фрагменты из второй колонки анализируют с помощью масс-спектрометра для определения аминокислотной последовательности пептидных фрагментов соответственно из первой колонки и второй колонки, при этом комбинирование последовательности элюированных пептидов из первой колонки и из второй колонки обеспечивают полную аминокислотную последовательность белка;
 - и компьютер в электронной связи с двухколоночной системой хроматографии для управления потоком жидкости через систему путем конфигурирования портов первого и второго мультипортовых переключающих распределительных клапанов во множественных конфигурациях.
12. Система по п.11, дополнительно содержащая масс-спектрометр, сообщающийся с помощью

жидкого соединения со вторым мультипортовым переключающимся перенаправляющим клапаном.

13. Система по пп.11, 12, отличающаяся тем, что указанные мультипортовые переключающиеся перенаправляющие клапаны содержат порты 1-6.

14. Система по любому из пп.11-13, отличающаяся тем, что указанные первая колонка и вторая колонка содержат разные упаковочные материалы.

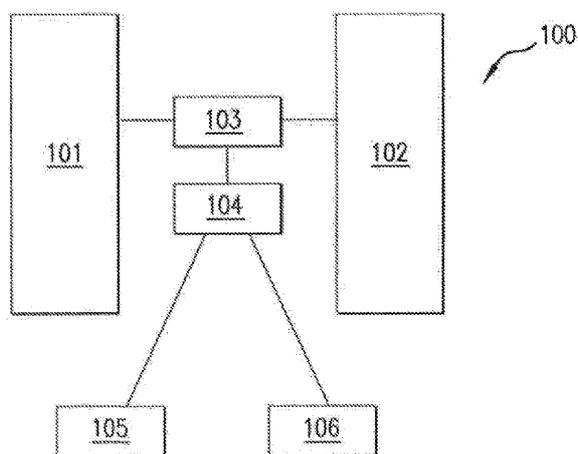
15. Система по п.14, отличающаяся тем, что указанная первая колонка заполнена материалом для отделения неполярных пептидов, а указанная вторая колонка заполнена материалом для разделения полярных пептидов.

16. Система по любому из пп.11-15, отличающаяся тем, что указанная первая колонка представляет собой пористую графитовую колонку.

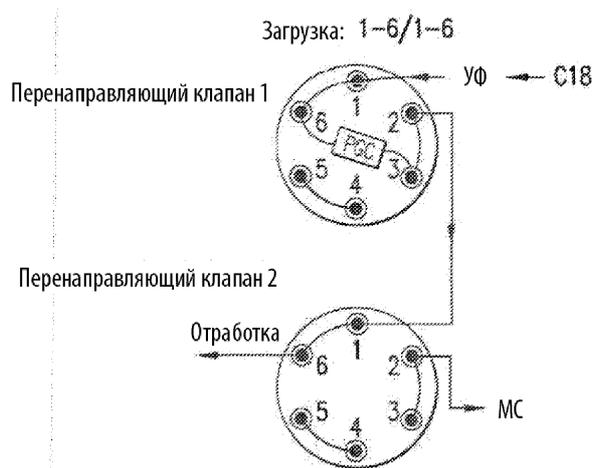
17. Система по любому из пп.11-16, отличающаяся тем, что указанная вторая колонка представляет собой пористую графитовую колонку.

18. Система по любому из пп.11-17, отличающаяся тем, что указанные мультипортовые переключающиеся перенаправляющие клапаны выполнены с возможностью пропускания жидкой среды из первой колонки через вторую колонку.

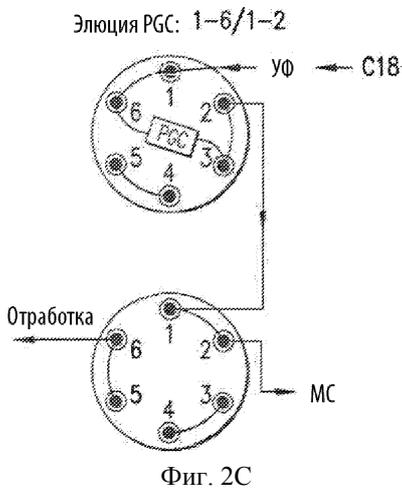
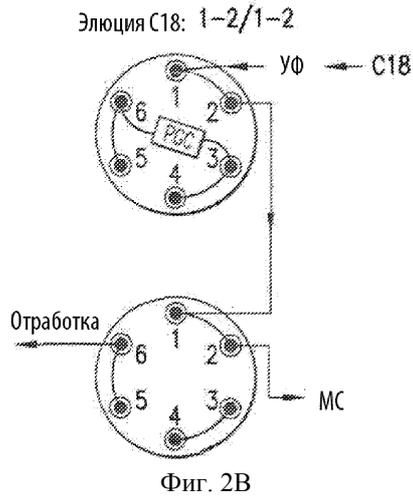
19. Система по любому из пп.11-17, отличающаяся тем, что указанные мультипортовые переключающиеся перенаправляющие клапаны выполнены с возможностью пропускания жидкой среды из первой колонки в обход второй колонки и ее протекания в масс-спектрометр.



Фиг. 1



Фиг. 2А



C18_PGC_PerMap_Top5_140min.meth — Настройки инструмента Thermo Xcalibur

Файл Помощь

Общие Списки
 Настройка Файлы **Переключатель Клапанов**
 Внешнее оборудование

Q Exactive Orbitrap MS

Переключающий клапан a
 Переключающий клапан b

Шприц
 Запиратель контакта
 Хроматограмма
 Группы сканирования

Элюция C18
 Элюция PGC

время (мин)

Настройки МС для C18 PerMap
 (Диапазон сканирования: 300 – 2000 мэ)

Настройки МС для PGC PerMap
 (Диапазон сканирования: 200 – 2000 мэ)

Top5

Эксперименты

Общие

Полный МС-SIM
 AIF
 Полный МС / AIF
 Полный МС / эд-МС² (TopN)
 Нацеленный- SIM
 PRM

Полный МС
 эдMS²

Полный МС
 эдMS²

Свойства

Свойства способа

Общие настройки
 Роль пользователя: Стандарт
 Использовать фикс. массы выкл.
 Хром. пик вл 15 с
 Время
 Продолжительность способа 125,0 мин
 Продолжительность способа
 Продолжительность способа

Свойства Полного МС / эд-МС²

Общие
 Время прогонки 0-100 мин
 Полярность положительный
 Заряд по умолчанию: 2
 Включение —
 Исключение —
 Тэги —

Полный МС
 Разрешение 70000
 АГС мишень 1e6
 Максимум ИТ 50 мс
 Диапазон сканирования 300-2000 м/з
 эд-МС²/ эд-SIM
 эд Настройки

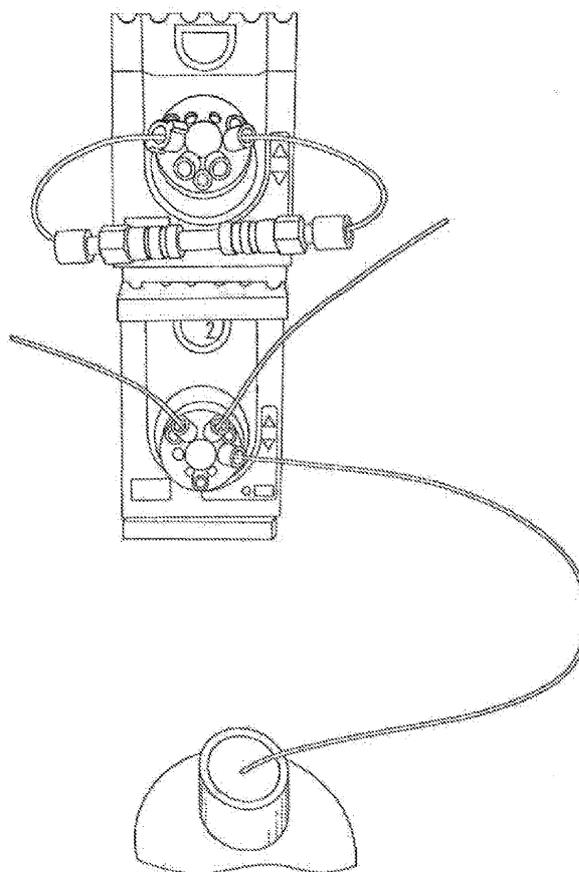
Настройки эксперимента | Обобщение

Готов

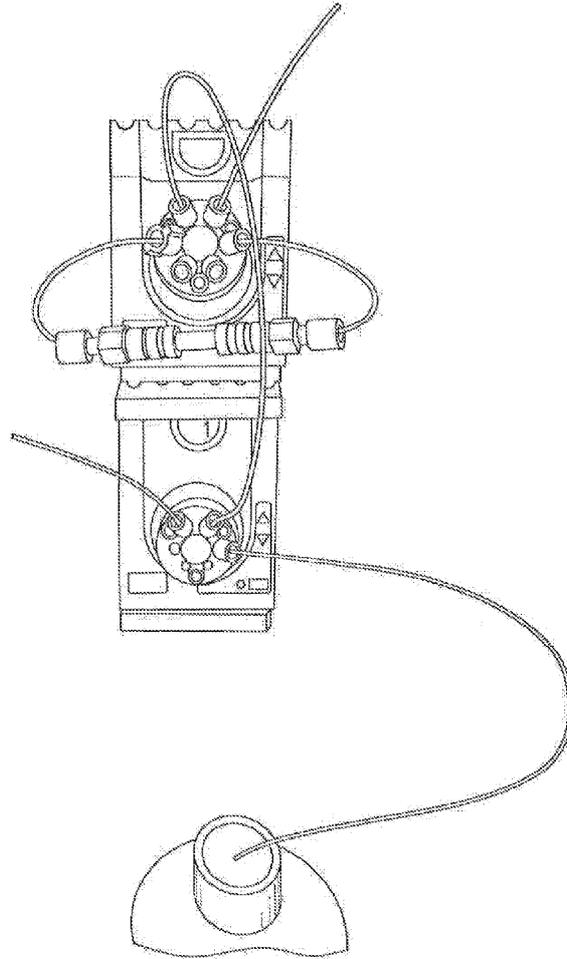
Фиг. 3

Подвижная фаза	А: 0,05% ТФА в воде Milli-Q				
	В: 0,045% ТФА в ацетонитриле				
Колонка	PGC: Гиперуглер. Пористый Графит Углерод Колонка 3мкм 2,1мм x 30мм				
	C18: ACQUITY UPLC BEH 130 C18 колонка, 1,7мкм, 2.1мм x 150мм				
Градиент	Время (мин)	Поток(мл/мин)	%А	%В	Типичный пептид C18 Картирующая прогонка Эквилибрация колонки PGC Градиент PGC
	0	0.25	99.9	0.1	
	5	0.25	99.9	0.1	
	80	0.25	65.0	35.0	
	85	0.25	10.0	90.0	
	90	0.25	10.0	90.0	
	95	0.25	99.9	0.1	
	100	0.25	99.9	0.1	
	105	0.25	99.9	0.1	
	120	0.25	0.0	100.0	
	122	0.25	0.0	100.0	
	125	0.25	99.9	0.1	
	140	0.25	99.9	0.1	

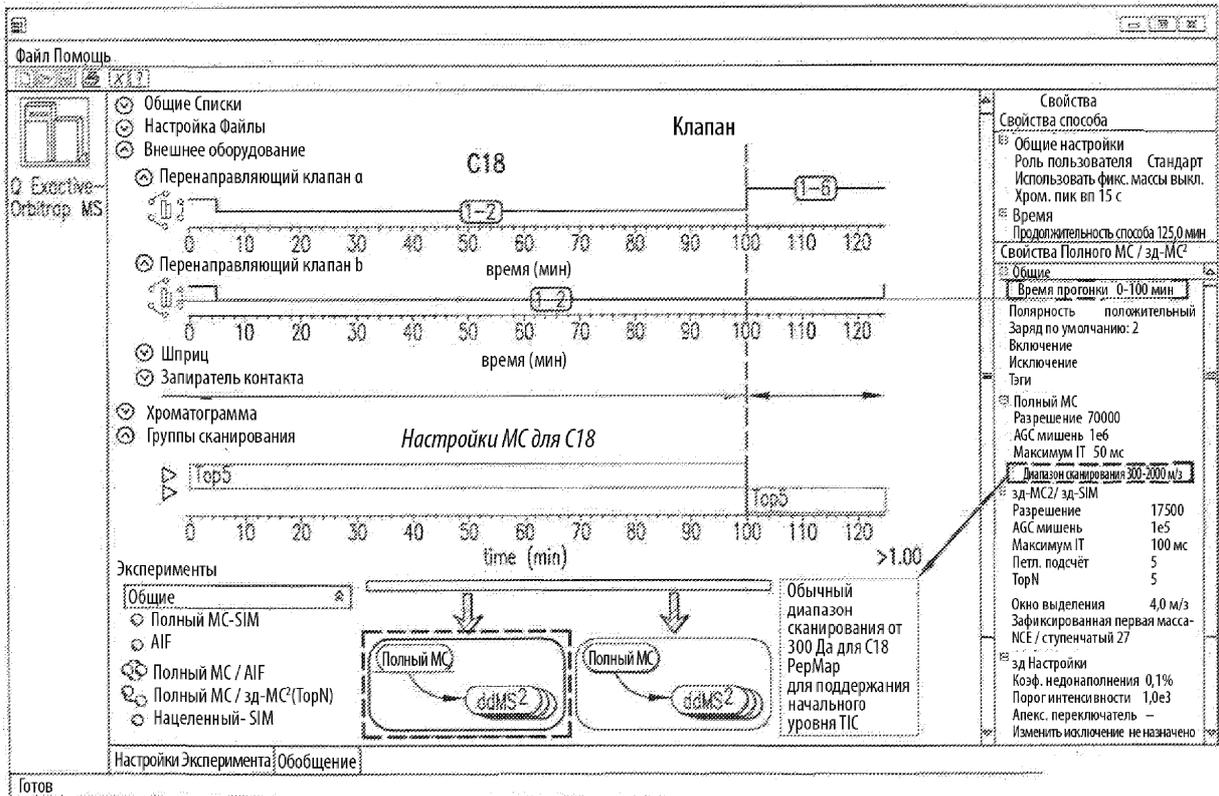
Фиг. 4



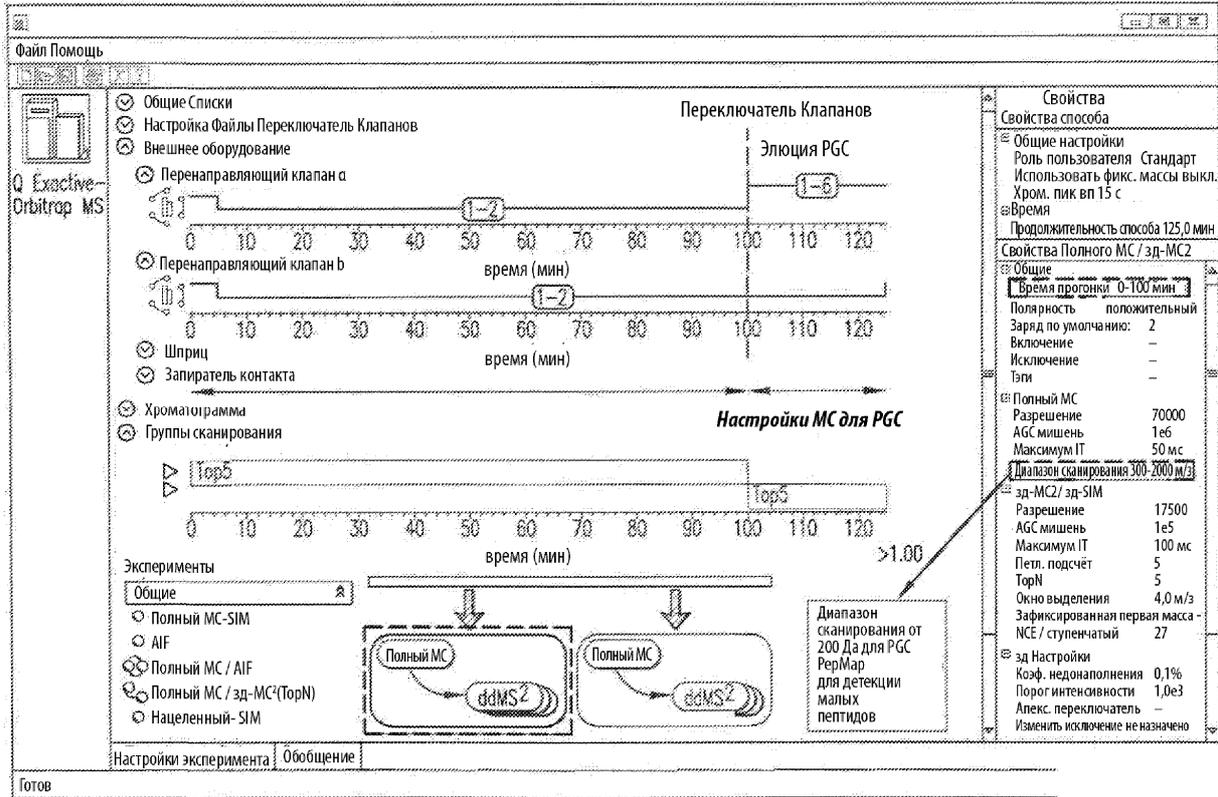
Фиг. 5А



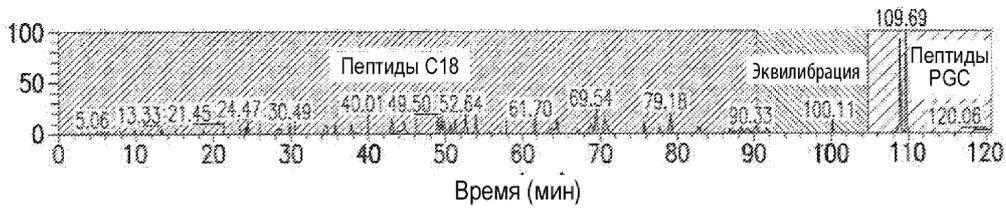
Фиг. 5В



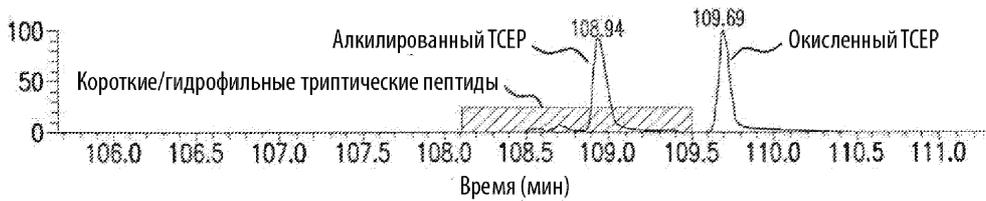
Фиг. 6А



Фиг. 6В



Фиг. 7А



Фиг. 7В

