

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391515** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.20

(51) Int. Cl. *H01J 49/00* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.17

(54) ОБЪЕКТИВНЫЕ И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ СОБОЙ БЕЛОК КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА, С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ ИТЕРАТИВНОЙ LC-MS/MS (HCP-AIMS) ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

(31) 63/114,746

(32) 2020.11.17

(33) US

(86) PCT/US2021/059642

(87) WO 2022/108981 2022.05.27

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

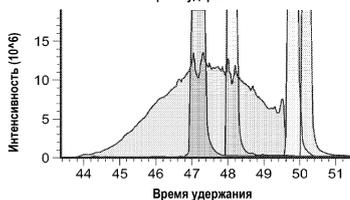
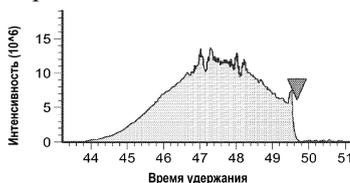
(72) Изобретатель:

Хуан Юй, Ху Мэнци, Цю Хайбо (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Данное изобретение в целом относится к способам идентификации и количественного определения белков клетки-хозяина (HCP) при разработке терапевтических белков. В частности, данное изобретение в целом относится к способам жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) для объективной идентификации и чувствительного количественного определения HCP при разработке терапевтических белков.



A1

202391515

202391515

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578250EA/061

ОБЪЕКТИВНЫЕ И ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ, ПРЕДСТАВЛЯЮЩИХ СОБОЙ БЕЛОК КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА, С ПОМОЩЬЮ АВТОМАТИЗИРОВАННОЙ ИТЕРАТИВНОЙ LC-MS/MS (HCP-AIMS) ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка заявляет приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/114,746, поданной 17 ноября 2020 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к способам идентификации и количественного определения белков клетки-хозяина (HCP) при разработке терапевтических белков. В частности, настоящее изобретение в целом относится к способам жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) для идентификации и чувствительного количественного определения HCP при разработке терапевтических белков.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

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

Жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) стала мощным методом мониторинга HCP-примесей в процессе разработки и аналитического исследования. Однако обычно существует компромисс между методами на основе масс-спектрометрии, которые могут обеспечить быструю и объективную идентификацию HCP, в сравнении с глубокой и чувствительной идентификацией белка или точным количественным определением белка из-за различий в сложности подготовки образцов, и методологиями LC-MS/MS.

Следует понимать, что существует потребность в способах надежной и

объективной идентификации и количественного определения НСР в фармацевтических продуктах для снижения рисков по безопасности и оптимизации качества.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определение приемлемых уровней примесей НСР стало критически важным вопросом при использовании систем биологической переработки для производства биофармацевтических продуктов. Существует необходимость идентификации и определения характеристик остаточных НСР-примесей для оптимизации безопасности и качества продуктов, представляющих собой терапевтические белки. В данной заявке представлены способы надежной идентификации и количественного определения НСР-примесей.

Данное изобретение относится к способу идентификации по меньшей мере одного белка клетки-хозяина (НСР) в образце, имеющем по меньшей мере один НСР и по меньшей мере другой белок. В некоторых типовых вариантах осуществления способ включает (a) пропускание образца через хроматографическую колонку для получения хроматографического пика элюирования; (b) выполнение анализа на основе тандемной масс-спектрометрии путем выполнения цикла зависящего сканирования в процессе образования хроматографического пика элюирования, причем цикл включает: (i) получение масс-спектрограммы; (ii) отбор множества ионов-предшественников из полученной масс-спектрограммы в виде набора автоматических исключений; и (iii) получение второй масс-спектрограммы после исключения множества из набора ионов-предшественников в наборе автоматических исключений; и (c) использование полученных масс-спектрограмм для идентификации по меньшей мере одного НСР после прогона цикла сбора данных в течение заданного числа раз.

В одном аспекте указанное заданное число циклов равняется одному, двум, трем, четырем или более циклам. В другом аспекте допустимая погрешность массы для отбора иона-предшественника для набора автоматических исключений составляет около 15 ppm. В другом аспекте допустимое отклонение времени удержания для отбора иона-предшественника для набора автоматических исключений составляет от около -0,2 минуты до около +0,4 минуты. В другом аспекте набор автоматических исключений также включает по меньшей мере один фоновый ион. В еще одном аспекте, набор автоматических исключений включает по меньшей мере один дополнительный ион-предшественник не из полученной масс-спектрограммы. В еще одном аспекте, ионы-предшественники из полученного масс-спектра не добавляются к набору автоматических исключений, если значения их интенсивности ниже заданного порога.

В одном аспекте образец готовят с использованием прямого расщепления. В другом аспекте образец готовят с использованием нативного расщепления. В другом аспекте образец готовят с использованием иммунопреципитации. В еще одном аспекте, образец готовят с использованием профилирования белков на основе активности. В другом аспекте, образец готовят с использованием фракционирования. В другом аспекте, образец готовят с использованием фильтрации.

В одном аспекте, хроматографическая колонка включает колонку для обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, колонку для ионообменной хроматографии, колонку для эксклюзионной хроматографии, колонку для аффинной хроматографии, колонку для хроматографии гидрофобного взаимодействия, колонку для хроматографии гидрофильного взаимодействия, колонку для хроматографии на комбинированных носителях или их комбинацию.

В одном аспекте образец содержит белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте, концентрация белка, представляющего интерес, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 10000 раз, по меньшей мере в 100000 раз или по меньшей мере в 1000000 раз превышает концентрацию по меньшей мере одного идентифицированного НСР. В еще одном конкретном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

В одном аспекте, масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или тройной квадрупольный масс-спектрометр, причем масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии. В конкретном аспекте, система LC-MS/MS сопряжена с системой для спектрометрии ионной подвижности в несимметричном поле высокой напряженности (FAIMS).

Данное изобретение также относится к способу количественного определения по меньшей мере одного белка клетки-хозяина (НСР) в образце, имеющем по меньшей мере один НСР и по меньшей мере другой белок. В некоторых типовых вариантах осуществления способ включает (а) пропускание образца через хроматографическую колонку для получения хроматографического пика элюирования; (b) выполнение анализа на основе тандемной масс-спектрометрии путем выполнения цикла зависимого сканирования в процессе образования хроматографического пика элюирования, причем цикл включает: (i) получение масс-спектрограммы; (ii) отбор множества ионов-предшественников из полученной масс-спектрограммы в виде набора автоматических исключений; и (iii) получение второй масс-спектрограммы после исключения множества из набора ионов-предшественников в наборе автоматических исключений; и (c) использование полученных масс-спектрограмм для количественного определения по меньшей мере одного НСР после прогона цикла сбора данных в течение заданного числа раз.

В одном аспекте указанное заданное число циклов равняется одному, двум, трем, четырем или более циклам. В другом аспекте допустимая погрешность массы для отбора иона-предшественника для набора автоматических исключений составляет около 15 ppm. В другом аспекте допустимое отклонение времени удержания для отбора иона-предшественника для набора автоматических исключений составляет от около -0,2 минуты до около +0,4 минуты. В другом аспекте набор автоматических исключений также включает по меньшей мере один фоновый ион. В еще одном аспекте, набор

автоматических исключений включает по меньшей мере один дополнительный ион-предшественник не из полученной масс-спектрограммы. В еще одном аспекте, ионы-предшественники из полученного масс-спектра не добавляются к набору автоматических исключений, если значения их интенсивности ниже заданного порога.

В одном аспекте образец готовят с использованием прямого расщепления. В другом аспекте образец готовят с использованием нативного расщепления. В другом аспекте образец готовят с использованием иммунопреципитации. В еще одном аспекте, образец готовят с использованием профилирования белков на основе активности. В другом аспекте, образец готовят с использованием фракционирования. В другом аспекте, образец готовят с использованием фильтрации.

В одном аспекте, хроматографическая колонка включает колонку для обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, колонку для ионообменной хроматографии, колонку для эксклюзионной хроматографии, колонку для аффинной хроматографии, колонку для хроматографии гидрофобного взаимодействия, колонку для хроматографии гидрофильного взаимодействия, колонку для хроматографии на комбинированных носителях или их комбинацию.

В одном аспекте образец содержит белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте, концентрация белка, представляющего интерес, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 10000 раз, по меньшей мере в 100000 раз или по меньшей мере в 1000000 раз превышает концентрацию по меньшей мере одного количественно определенного НСР. В еще одном конкретном аспекте, белок, представляющий интерес, представляет собой антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

В одном аспекте, масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или тройной квадрупольный масс-спектрометр, причем масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии. В конкретном аспекте, система LC-MS/MS сопряжена с системой для спектрометрии ионной подвижности в несимметричном поле высокой напряженности (FAIMS).

Эти и другие аспекты данного изобретения будут более очевидны и понятны при рассмотрении в сочетании с нижеследующим описанием и прилагаемыми чертежами. Нижеследующее описание, несмотря на упоминание различных вариантов реализации изобретения и их конкретных многочисленных деталей, приводится в качестве иллюстрации, а не ограничения. В пределах объема данного изобретения можно выполнять множественные замены, модификации, добавления или перестановки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1А показана хроматограмма выделенных ионов (EIC), на которой проиллюстрирована интерференция интенсивности сигнала иона из-за присутствия других ионов с большой распространенностью. На верхней панели показана EIC пептида с искаженной формой пика, а на нижней панели показаны EIC нескольких других пептидов

(показаны фиолетовым, синим, зеленым и т. д.), коэлюированных с пептидом из верхней панели. На ФИГ. 1В показано сравнение полных масс-спектров (MS1) выбранного пептида до и после отмеченной точки (красный треугольник) на панели А.

На Фигурах 2А и 2В показано применение HSP-AIMS с использованием автоматизированных прогонов итеративной MS/MS и отбором ионов-предшественников согласно типовому варианту осуществления данного изобретения. На ФИГ. 2А показана хроматограмма с основным пиком (BPC) для трех повторов итеративной MS/MS (от верхней, средней к нижним панелям, соответственно 1-я, 2-я и 3-я MS BPC). На ФИГ. 2В показаны масс-спектры из каждого итеративного повтора для времени удержания, обозначенного на ФИГ. 2А. Красными ромбами обозначены ионы-предшественники, отобранные для MS/MS-сканирования в каждом прогоне итеративной MS/MS.

На ФИГ. 3А показаны масс-спектры для выбранного времени удержания, обозначенного на ФИГ. 3В незаштрихованным перевернутым треугольником, согласно типовому варианту осуществления данного изобретения. Звездочки в верхней части кластера изотопов указывают на то, что количество ионов достигло области нелинейности. На ФИГ. 3В показана хроматограмма с основным пиком четырех прогонов с различными количествами загрузки (от 30 до 45 мкг, от верхней панели к нижней панели) вводимого расщепленного белка согласно типовому варианту осуществления данного изобретения. На ФИГ. 3С показаны отклики детектора, выраженные в виде площади пика, семи отобранных пептидов из этих четырех прогонов с разными количествами загрузки на ввод согласно типовому варианту осуществления данного изобретения.

На Фигурах 4А-4L показаны хроматограммы выделенных ионов трех изотопных переходов от ионов пептида PLBL2 в образцах с разным уровнем добавления, с идентификацией, показанной в Skyline в виде вертикальной полосы, согласно типовому варианту осуществления данного изобретения. На Фигурах 4А-С проиллюстрировано добавление 10 ppm PLBL2. На Фигурах 4D-F проиллюстрировано добавление 20 ppm PLBL2. На Фигурах 4G-I проиллюстрировано добавление 30 ppm PLBL2. На Фигурах 4J-L проиллюстрировано добавление 50 ppm PLBL2.

На ФИГ. 5А показано сравнение пар спектр-пептид (PSM) для трех повторов из автоматизированной MS/MS для уровня 3 добавления белка (L3) согласно типовому варианту осуществления данного изобретения. На ФИГ. 5В показано сравнение PSM для трех повторов из итеративной MS/MS для L3 согласно типовому варианту осуществления данного изобретения. На Фигурах 5А и 5В на верхнем столбчатом графике показаны PSM для каждого повторного прогона; на нижней диаграмме Венна показано перекрытие PSM.

На ФИГ. 6 показаны пары спектр-пептид (PSM) для трех повторов автоматизированной итеративной MS/MS образца NIST mAb согласно типовому варианту осуществления данного изобретения. На верхнем столбчатом графике показаны PSM для каждого повторного прогона; на нижней диаграмме Венна показано перекрытие PSM.

На Фигурах 7А-7С представлены показатели производительности в тесте

надежности прибора для девяти пептидов в рамках 300 введений согласно типовому варианту осуществления данного изобретения. На ФИГ. 7А показан график общей площади для MS1. На ФИГ. 7В показан график времени удержания. На ФИГ. 7С показан график средней погрешности массы иона-предшественника.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Белки клетки-хозяина (НСП) представляют собой технологические примеси, возникающие при продукции терапевтических белков в качестве лекарственных средств. НСП обычно являются крайне важным показателем качества с очень низкими уровнями (обычно ниже 100 ppm), в отношении которых требуется разработка методов тщательной очистки и строгая стратегия контроля безопасности и эффективности лекарственных средств (Hogwood et al., 2014, *Curr Opin Biotechnol*, 30:153-160). Остаточные НСП могут повлиять на безопасность продукта из-за иммуногенности, токсичности или неизвестной нецелевой ферментативной активности. Они могут повлиять на эффективность продукта вследствие воздействия на стабильность лекарственного средства, стабильность вспомогательного вещества, фармакокинетику лекарственного средства или путем конкуренции за связывание с активным сайтом биологической мишени. На разных стадиях разработки лекарственного средства потребность в анализе НСП меняется в зависимости от глубины характеристики и пропускной способности серии образцов (Hogwood et al., 2013, *Bioengineered*, 4:288-291; Zhu-Shimoni et al., 2014, *Biotechnol Bioeng*, 111:2367-2379). При разработке клеточной линии для экспрессии терапевтических белков зачастую получают от сотен до тысяч образцов, при этом НСП могут не представлять критической проблемы. Для последующего отбора клеточной линии-кандидата с этапом очистки может потребоваться анализ общего НСП для минимизации потенциального риска (Zhu-Shimoni et al.; Tscheliessnig et al., 2013, *Biotechnol J*, 8:655-670). В ходе последующей разработки процесса очистки обычно проводят исследования с использованием подхода на основе планирования эксперимента (DOE) для оценки взаимосвязи между параметрами процесса и показателями качества лекарственного средства, включая НСП. Хотя анализы НСП на основе ELISA широко используются для количественного определения, им не хватает целостного профиля и охвата всех отдельных НСП, где анализ в отношении определенных НСП был бы крайне важным для снижения общих уровней НСП (Falkenberg et al., 2019, *Biotechnol Prog*, 35:e2788). Как результат, часто требуется относительно более высокопроизводительный и менее смещенный метод анализа НСП, чтобы облегчить разработку метода очистки для очистки от НСП.

Для подробной идентификации НСП и точного количественного определения отдельных белков широко использовался рабочий цикл методов протеомики «снизу вверх» с использованием жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) (Zhu-Shimoni et al.; Bracewell et al., 2015, *Biotechnol Bioeng*, 112:1727-1737; Krawitz et al., 2006, *Proteomics*, 6:94-110; Gao et al., 2020, *Anal Chem*, 92:1007-1015; Reiter et al., 2019, *J Pharm Biomed Anal*, 174:650-654; Johnson et al., 2018, *Biologicals*, 52:59-66; Park et al., 2017, *Sci Rep*, 7:44246; Park et al., 2017, *Biotechnol Bioeng*, 114:2267-2278;

Kreimer et al., 2017, *Anal Chem*, 89:5294-5302). Однако обычно существует компромисс между методами на основе масс-спектрометрии, которые могут обеспечить быструю и объективную идентификацию НСР, в сравнении с глубокой и чувствительной идентификацией белка или точным количественным определением белка из-за различий в сложности подготовки образцов, и методологиями LC-MS/MS.

Прямое расщепление образцов белка для анализа НСР почти всегда желательно для идентификации и количественного определения НСР. Как правило, оно требует минимальной обработки образцов и, как результат, может поддерживать количественные профили отдельных НСР. Однако, широкий динамический диапазон лекарственного средства в сравнении с примесями, представляющими собой белок клетки-хозяина, представляет собой огромную проблему для идентификации НСР с помощью MS. Например, в традиционных способах протеомики, таких как зависимое сканирование (DDA), происходит фрагментирование только наиболее распространенных предшественников в образце, и, как результат, обычно упускаются ионы белка клетки-хозяина с малой распространенностью. Способы DDA по своей природе имеют некоторые ограничения для идентификации белков с большим динамическим диапазоном распространенности. Такое ограничение связано с конечным числом предшественников, выбранных для сканирования MS2 в каждом сканировании MS1, где «MS1» и «MS2» обозначают соответственно первый и второй масс-анализ в тандемной масс-спектрометрии. Из-за фактического рабочего цикла MS2-сканирований, некоторые комплексные MS1-сканирования имеют очень малочисленный отбор ионов-предшественников для MS2, в результате чего большое число предшественников не проходит отбор для MS2-идентификации. Кроме того, флуктуация низкоуровневых ионов при комплексном MS1-сканировании может приводить к стохастическому отбору предшественников, что приводит к противоречивым или дополнительным идентификациям при каждом повторном введении.

Альтернативно, LC-MS/MS с независимым сканированием (DIA), особенно способ SWATH, был показан как многообещающая стратегия для одновременной идентификации и количественного определения белков (Heissel et al., 2018, *Protein Expr Purif*, 147:69-77; Walker et al., 2017, *MAbs*, 9:654-663). Хотя при использовании метода на основе DIA можно генерировать мультиплексированный MS2 из окна ионов-предшественников, захватывая фрагменты для MS2 теоретически из всех предшественников, он по-прежнему сталкивается с проблемой интерференции малых динамических диапазонов. Кроме того, большое препятствие заключается в обработке данных для эффективной и надежной идентификации белка, а также в предпосылке создания библиотеки белков. Все эти проблемы ограничивают рутинное применение DIA в НСР-анализе при разработке лекарственных средств. Таким образом, DDA по-прежнему служит основным методом первоначальной идентификации пептидов и белков для большинства способов LC-MS/MS.

Было показано, что недавняя разработка нового способа сбора данных MS для

глубокой протеомики, итеративного исключения ионов-предшественников, увеличивает глубину традиционной тандемной MS (Zhang, 2012, *J Am Soc Mass Spectrom*, 23:1400-1407; Wu et al., 2012, *Proteomics Clin Appl*, 6:304-308; Wang et al., 2008, *Anal Chem*, 80:4696-4710; Zhou, et al., 2015, *J Proteomics Bioinform*, 8:260-265). В итеративном варианте способа идентификация ионов-предшественников новых и уникальных пептидов будет увеличиваться по мере того, как другие предшественники, которые уже были отобраны для фрагментации для MS/MS, будут исключены из дальнейшего анализа. Итеративная MS/MS является простым способом сбора данных, который может обеспечить идентификацию и относительную количественную оценку НСР, представленных на низких уровнях, без необходимости обогащения.

Для удовлетворения требованиям НСР-анализа, которые заключаются в коротком промежутке времени рабочего цикла и надежности, при одновременном снижении потенциального риска высоких уровней отдельных НСР в ходе разработки процесса и аналитического исследования, в данном документе описана простая, надежная и объективная стратегия НСР-анализа, в которой используется автоматизированный способ сбора данных с исключением ионов-предшественников (PIE), называемый НСР-автоматизированной итеративной MS или НСР-AIMS. В подходе НСР-AIMS могут использоваться подвергнутые прямому расщеплению образцы без необходимости какого-либо обогащения или предварительной обработки образцов. С помощью стратегии НСР-AIMS ионы-предшественники пептидов НСР с малой распространенностью могут быть отобраны для идентификации MS/MS в итеративных повторах. Следовательно, этот подход позволяет достичь более глубокой объективной идентификации НСР по сравнению с обычным способом зависимого сканирования (DDA) с пределом обнаружения около 10 ppm или меньше. В то же время сочетание этого способа с использованием аналитической проточной UHPLC позволяет сделать весь рабочий процесс НСР-AIMS очень надежным, воспроизводимым и подходящим для высокопроизводительного НСР-анализа при разработке и определении характеристик лекарственных средств, представляющих собой терапевтические белки.

По сравнению со способами НСР-анализа, упомянутыми выше, рабочий процесс НСР-AIMS, описанный в данном документе, представляет собой простой, надежный и чувствительный подход, подходящий для высокопроизводительного анализа с адекватной идентификацией и количественным определением белка. Возможность простой обработки образцов с помощью прямого расщепления обеспечивает возможность расщепления с использованием планшетов и автоматизации для обеспечения крупномасштабной и высокопроизводительной подготовки образцов. Автоматизированный итеративный сбор данных MS/MS обеспечивает возможность быстрой и глубокой идентификации белков. В сочетании с надежной и высокостабильной MS и системой LC с постоянным потоком, способ НСР-AIMS является подходящим для поддержки разработки процесса, особенно для целей DOE для определения наилучших условий процесса для устранения НСР. Нетрудозатратная и простая подготовка образцов, совместимая с рабочим процессом

НСР-AIMS, также обеспечивает возможность быстрой и объективной идентификации и количественного определения НСР при определении характеристик лекарственных средств-кандидатов, изучение результатов НСР, не соответствующих нормам спецификации (OOS), и не соответствующих предыдущим данным (OOT). Этот способ служит в качестве надежного и объективного НСР-анализа, снижая риск переноса большого количества проблемных НСР в конечные лекарственные продукты и обеспечивая высокое качество терапевтических средств на основе белков в клинике.

В данном изобретении описан способ идентификации и количественного определения белков клетки-хозяина при разработке терапевтических белков.

Если не указано иное, все применяемые в данном документе технические и научные термины имеют те же значения, которые обычно понятны рядовому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании, далее будут описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в данный документ посредством ссылки.

Формы единственного числа следует понимать как означающие «по меньшей мере один», а термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают специалисты в данной области техники, и в случаях, когда 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.

В контексте данного документа термин «база данных» относится к биоинформатическим инструментам, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров MS-MS по всем возможным последовательностям в базе(базах) данных. Неограничивающие примеры таких инструментов представляют собой Mascot (<http://www.matrixscience.com>), Spectrum Mill (<http://www.chem.agilent.com>), PLGS (<http://www.waters.com>), PEAKS (<http://www.bioinformaticssolutions.com>), Proteinpilot (<http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot>), Phenyx (<http://www.phenyx-ms.com>), Sorcerer (<http://www.sagenresearch.com>), OMSSA (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/>), X!Tandem (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>), Protein Prospector (<http://www.http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>) или Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

В контексте данного документа термин «белки клетки-хозяина» (НСР) включает белок, полученный из клетки-хозяина, и может не иметь отношения к желаемому белку, представляющему интерес. Белки клетки-хозяина могут представлять собой технологическую примесь, которая может образовываться в процессе производства, и

может включать три основные категории: примеси, происходящие из клеточного субстрата; примеси, происходящие из клеточной культуры, и примеси, образующиеся на последующих стадиях процесса. Примеси, происходящие из клеточного субстрата, включают, без ограничений, белки, происходящие из организма хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или общую ДНК клетки-хозяина). Примеси, происходящие из клеточной культуры, включают, без ограничений, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, образующиеся на последующих стадиях процесса, включают, без ограничения, ферменты, реагенты для химической и биохимической обработки (например, цианогенбромид, гуанидин, окисляющие и восстанавливающие реагенты), неорганические соли (например, тяжелых металлов, мышьяка, неметаллического иона), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие вымываемые вещества.

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 обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия или хроматографию на комбинированных носителях. В некоторых аспектах, образец, содержащий по меньшей мере один НСР, можно подвергать любому из вышеупомянутых хроматографических способов или их комбинации.

В контексте данного документа термин «масс-спектрометр» включает устройство, выполненное с возможностью идентификации конкретных молекулярных фрагментов и измерения их точных масс. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в который может быть элюирован полипептид или пептид для определения характеристик. Масс-спектрометр может включать три основных части: источник ионов, масс-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 типовых вариантах осуществления масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр. В контексте данного документа термин «тандемная масс-спектрометрия» включает методику, в которой структурную информацию о молекулах образца получают посредством применения множества этапов отбора по массе и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что молекулы образца должны быть переведены в газовую фазу и ионизированы таким образом, чтобы фрагменты образовывались предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массе. Многоступенчатая

MS/MS, или MSⁿ, может быть выполнена путем сначала отбора и выделения иона-предшественника (MS²), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона (MS³), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (MS⁴) и т.д. до тех пор, пока можно получить значимую информацию или можно обнаружить сигнал фрагментного иона. Тандемную 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. Две основные категории способов тандемной MS представляют собой «тандем в пространстве» и «тандем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «тандем во времени» соединены в пространстве или с анализаторами «тандем в пространстве». Масс-спектрометр «тандем в пространстве» включает источник ионов, устройство активации ионов-предшественников и по меньшей мере два масс-анализатора без захвата. Конкретные функции m/z разделения могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной секции прибора ионы выбирали, диссоциировали в промежуточной области, а ионы продукта затем передавали в другой анализатор для m/z разделения и сбора данных. В масс-спектрометре «тандем во времени» ионы, образующиеся в источнике ионов, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по m/z в одном и том же физическом устройстве. Идентифицированные масс-спектрометром пептиды могут использоваться в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно использовать для определения характеристик белков посредством сопоставления экспериментальных и теоретических данных MS/MS, при этом последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Указанное определение характеристик включает, без ограничений, секвенирование аминокислот белковых фрагментов, проведение секвенирования белка, проведение секвенирования белка *de novo*, локализацию посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

В некоторых аспектах, масс-спектрометр в способе или системе по данной заявке может быть масс-спектрометром с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением или масс-спектрометром с тройным квадруполем, причем масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии, при этом масс-спектрометр способен выполнять анализы LC-MS (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией) или LC-MRM-MS (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией в режиме отслеживания множественных реакций).

В контексте данного документа термин «масс-анализатор» включает устройство, способное разделять фрагменты, то есть атомы, молекулы или кластеры, по их массе. Неограничивающие примеры масс-анализаторов, которые можно использовать, представляют собой времяпролетный (TOF), магнитоэлектрический сектор, квадрупольный масс-фильтр (Q), квадрупольную ионную ловушку (QIT), орбитальную

ионную ловушку, масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (FTICR), а также методику масс-спектрометрии с ускорителем (AMS).

В контексте данного документа термин «ионизация электрораспылением» или «ESI» относится к способу распылительной ионизации, при котором катионы или анионы в растворе переносятся в газовую фазу путем образования и десольватации при атмосферном давлении пара из сильно заряженных капелек, получаемого при приложении разности потенциалов между наконечником распыляющего капилляра, содержащего раствор, и противоэлектродом. В общем, существует три основных этапа получения ионов в газовой фазе из ионов электролитов в растворе. Они заключаются в следующем: (а) образование заряженных капелек на наконечнике для инфузии ES; (б) сжатие заряженных капелек в результате испарения растворителя и повторный распад капелек, приводящий к образованию небольших сильно заряженных капелек, способных производить ионы в газовой фазе; и (с) механизм образования ионов газовой фазы из очень маленьких и сильно заряженных капелек. Стадии (а)-(с) в целом протекают в части устройства с атмосферным давлением. В некоторых типовых вариантах осуществления, масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может быть масс-спектрометром с ионизацией наноэлектрораспылением.

В контексте данного документа термин «белок» или «белок, представляющий интерес» может включать любой полимер из аминокислот, имеющий ковалентные амидные связи. Белки содержат одну или несколько полимерных цепей из аминокислот, в целом известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов, связанных пептидными связями, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов. Термин «синтетические пептиды или полипептиды» относится к не встречающимся в природе пептидам или полипептидам. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные методы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или несколько полипептидов, образуя одну функционирующую биомолекулу. Белок может включать фрагменты антител, наноантитела, 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 основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, может представлять собой рекомбинантный белок, антитело, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок, scFv и их комбинации.

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 типовых вариантах осуществления рекомбинантный белок может представлять собой антитело, например, химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело. В определенных типовых 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 типовых вариантах осуществления молекула антитела представляет собой полноразмерное антитело (например, иммуноглобулин IgG1 или IgG4) или, альтернативно, антитело может представлять собой фрагмент (например, Fc-фрагмент или Fab-фрагмент).

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 amino-конца к карбокси-

концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления данного изобретения FR антитела к big-ET-1 (или его антигенсвязывающая часть) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определять на основе сравнительного анализа двух или более CDR. Термин «антитело» в контексте данного документа также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полных антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. д. в контексте данного документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методов генной инженерии 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, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно подвергать секвенированию и химическим манипуляциям с применением методов молекулярной биологии, например, чтобы разместить один или несколько переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для включения кодонов, внесения цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

В контексте данного документа термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, без ограничений, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело dsFv, dAb-фрагмент, Fd'-фрагмент, Fd-фрагмент и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Fv-фрагменты 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 типовых 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 типовых 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. Альтернативно, или дополнительно, фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно, или дополнительно, фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, с помощью дисульфидных связей. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот, и более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

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 к избирательному связыванию двух разных эпитопов (первого эпитопа и второго эпитопа), аффинность первой тяжелой цепи в отношении первого эпитопа обычно будет по меньшей мере на один-два или три или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи в отношении второго эпитопа, 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 могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен СН1, шарнир, домен СН2 и домен СН3, 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 несколько 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. 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 Triomab, IgG с выступами во впадинах (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, Ig с двумя вариабельными доменами (DVD-Ig), Fab «два в одном» или двойного действия (DAF), IgG-одноцепочечные Fv (IgG-scFv) или кл-тела. Различные отличные от IgG-подобных молекул форматы включают тандемные scFv, формат диатела, одноцепочечное диатело, тандемные диатела (TandAbs), молекулу переориентирующегося антитела с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, наноантитела или антитела, получаемые с помощью метода «замка на причале» (dock-and-lock, DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265-310 (2014), все идеи которого включены в данный документ).

В контексте данного документа термин «полиспецифическое антитело» относится к антителу со специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух различных антигенов. 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 системой и способом, раскрытыми в данном документе.

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 данного 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 комбинаций.

В некоторых типовых 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), устойчивые 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 Hep-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 M-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), фибробласты из любой ткани или органа (в том числе, без ограничения, сердца, печени, почки, толстой кишки, кишечника, пищевода, желудка, нервной ткани (головного мозга, спинного мозга), легкого, сосудистой ткани (артерии, вены, капилляра), лимфоидной ткани (лимфатической железы, аденоидов, миндалин, костного мозга и крови), 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).

В контексте данного документа термин «расщепление» относится к гидролизу одной или нескольких пептидных связей белка. Существует несколько подходов к проведению расщепления белка в образце с помощью пригодного гидролизующего средства, например, ферментативное расщепление или неферментативное расщепление.

Один из широко распространенных способов расщепления белков в образце предполагает применение протеаз. Существует множество протеаз, и каждая из них имеет свои особенности в плане специфичности, эффективности и оптимальных условий расщепления. Протеазы относятся как к эндопептидазам, так и к экзопептидазам, которые классифицируются на основе способности протеазы расщеплять неконцевые или концевые аминокислоты в пептиде. Альтернативно, протеазы также относятся к шести различным классам: аспарагиновые, глутаминовые и металлопротеазы, цистеиновые, сериновые и треониновые протеазы, которые классифицируются на основе механизма катализа. Термины «протеаза» и «пептидаза» применяются взаимозаменяемо для обозначения ферментов, которые гидролизуют пептидные связи.

Помимо приведения белка клетки-хозяина в контакт с гидролизующим средством, указанный способ может необязательно включать этапы восстановления белка клетки-хозяина, алкилирования белка клетки-хозяина, поддержания определенного диапазона значений pH для белка клетки-хозяина и/или обессоливания матрицы образца. Эти этапы могут быть выполнены любым подходящим способом по желанию.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может необязательно включать приведение белка клетки-хозяина в контакт со средством, восстанавливающим белок.

В контексте данного документа термин «средство, восстанавливающее белок»

относится к средству, используемому для восстановления дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающими примерами средств, восстанавливающих белок, являются дитиотреитол (ДТТ), β-меркаптоэтанол, реактив Эллмана, гидроксилamina гидрохлорид, цианоборгидрид натрия, трис-(2-карбоксиитил)фосфин гидрохлорид (ТСЕР-НСl) или их комбинации.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может необязательно включать приведение белка клетки-хозяина в контакт со средством, алкилирующим белок.

В контексте данного документа термин «средство, алкилирующее белок» относится к средству, используемому для алкилирования определенных свободных аминокислотных остатков в белке. Неограничивающими примерами средств, алкилирующих белок, являются йодацетамид (IOA), хлорацетамид (CAA), акриламид (AA), N-этилmaleимид (NEM), метилметантиосульфат (MMTS) и 4-винилпиридин или их комбинации.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может включать денатурацию белка клетки-хозяина, фильтрование белка клетки-хозяина с использованием фильтра с границей отсечки по молекулярному весу задерживаемых компонентов и идентификацию белка клетки-хозяина с использованием подхода протеомики «снизу вверх» или метода дробовика.

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

В некоторых типовых вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может необязательно включать нативное расщепление. В контексте данного документа «нативное расщепление» относится к расщеплению белков в неденатурирующих условиях.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ определения характеристик белка клетки-хозяина может необязательно включать обогащение белками клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с хроматографической подложкой и выполнение этапа фракционирования. В контексте данного документа

термин «фракционирование» может включать процесс разделения различных пептидов, полученных в результате расщепления белков клетки-хозяина, присутствующих в матрице образца. Указанный процесс может включать разделение пептидов с использованием пригодной(пригодных) методики(методик) фракционирования пептидов, с помощью которой(которых) можно фракционировать пептиды на основе их различных общих свойств, таких как pI пептидов, гидрофобность, способность связывать металлы, содержание открытых тиольных групп, размер, заряд, форма, растворимость, стабильность и скорость седиментации, способность связываться с различными ионными группами и аффинность к субстратам в качестве основы для выделения пептида(пептидов) из сложных матриц биологических образцов. Пептиды также можно разделять на основе их клеточного расположения, что позволяет извлекать цитоплазматические, ядерные и мембранные белки.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ определения характеристик белка клетки-хозяина может необязательно включать обогащение белками клетки-хозяина в матрице образца с использованием иммунопреципитации (IP). В контексте данного документа термин «иммунопреципитация» может включать процесс осаждения белкового антигена из раствора с использованием антитела, которое специфически связывается с таким конкретным белком. Иммунопреципитация может быть прямой, когда антитела к целевому белку иммобилизуют на твердофазной подложке, или непрямой, когда свободные антитела добавляют к белковой смеси, и последние захватываются, например, гранулами с белком A/G.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ определения характеристик белка клетки-хозяина может необязательно включать обогащение белками клетки-хозяина в матрице образца с использованием профилирования белков на основе активности (ABPP). В контексте данного документа термин «профилирование белков на основе активности» может включать процесс иммобилизации целевого белка с использованием зонда с зависимой от активности генерацией сигнала, состоящего из реакционноспособной «боеголовки», линкера и метки. Неограничивающие примеры зондов включают зонды для мечения серингидролаз, включая азидо-FP, биотин-FP, дестиобиотин-FP или TAMRA-FP, зонды для мечения цистеиновых протеаз или липидные зонды. Неограничивающие примеры меток включают флуорофоры, аффинные метки или красящие метки.

В контексте данного документа, «образец», «матрицу образца» или «биологический образец» можно получать на любом этапе биопроцесса, как, например, на этапе культуральной жидкости (CCF), собранной культуральной жидкости (HCCF), определения эффективности процесса (PPQ), на любом этапе последующей обработки, на этапе лекарственного вещества (DS) или лекарственного продукта (DP), содержащего конечный составленный продукт. В некоторых других конкретных типовых вариантах осуществления биологический образец может быть отобран на любом этапе последующего процесса: осветления, хроматографической очистки, вирусной

инактивации или фильтрации. В некоторых конкретных типовых вариантах осуществления лекарственный продукт может быть отобран из изготовленного лекарственного продукта в ходе клинического применения, транспортировки, хранения или определенных манипуляций.

В контексте данного документа термин «начальные этапы технологического процесса» в контексте получения белка относится к действиям, включающим получение и сбор белков из клеток в ходе или после культивирования клеток-продуцентов белка, представляющего интерес. В контексте данного документа термин «культивирование клеток» относится к способам получения и поддержания популяции клеток-хозяев, способных продуцировать рекомбинантный белок, представляющий интерес, а также способам и методикам оптимизации продукции и сбора белка, представляющего интерес. Например, после включения вектора экспрессии в соответствующую клетку-хозяина, указанную клетку-хозяина можно поддерживать в условиях, подходящих для экспрессии соответствующих последовательностей, кодирующих нуклеотиды, а также для сбора и продукции желаемого рекомбинантного белка.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ по данному изобретению включает заданное число циклов анализа на основе тандемной масс-спектрометрии. В одном аспекте число циклов равняется одному, двум, трем, четырем или более циклам. Число циклов может быть выбрано в зависимости от потребностей пользователя в отношении количества образца, временных характеристик, числа пар спектр-пептид, точности количественного определения или других потребностей, которые могут быть легко определены специалистом в данной области техники.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ по данному изобретению включает установление определяемой пользователем допустимой погрешности массы и исключения по допустимому отклонению времени удержания для определения добавления ионов-предшественников к набору автоматических исключений. допустимая погрешность массы может равняться 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 ppm или другому значению согласно потребностям пользователя, которые могут быть легко определены специалистом в данной области техники. Исключение по допустимому отклонению времени удержания может составлять от -0,5 мин, -0,4 мин, -0,3 мин, -0,2 мин, -0,1 мин или 0 мин до +0,8 мин, +0,7 мин, +0,6 мин, +0,5 мин, +0,4 мин, +0,3 мин, +0,2 мин, +0,1 мин или 0 мин, или оно может предусматривать другой диапазон согласно потребностям пользователя, которые могут быть легко определены специалистом в данной области техники.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ по данному изобретению включает получение набора автоматических исключений, который используется для исключения ионов-предшественников для фрагментации ионов. В одном аспекте ионы-предшественники, обнаруженные на масс-спектрограмме, добавляют к набору автоматических исключений. В другом аспекте набор автоматических исключений также включает фоновые ионы. Фоновые ионы могут присутствовать на всех масс-

спектрограммах и не отражать истинные пептидные продукты. Фоновые ионы могут быть легко идентифицированы специалистом в данной области техники. В другом аспекте, набор автоматических исключений включает по меньшей мере один дополнительный ион-предшественник не из полученной масс-спектрограммы. Пользователь может заранее определить по меньшей мере один ион-предшественник, который не должен быть фрагментирован, даже если он еще не был обнаружен на масс-спектрограмме. В еще одном аспекте, ионы-предшественники из полученного масс-спектра не добавляются к набору автоматических исключений, если значения их интенсивности ниже заданного порога. Пользователь может захотеть повторить анализ масс-спектра иона-предшественника, если предыдущий сбор данных характеризовался низким качеством или слабым сигналом интенсивности.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ по данному изобретению включает образец, имеющий по меньшей мере один НСР и по меньшей мере другой белок. Относительная концентрация НСР может быть выражена в виде частей на миллион, или ppm, относительно концентрации другого белка. Другим белком может быть белок, представляющий интерес. Таким образом, если НСР в образце, включающем НСР и белок, представляющий интерес, присутствует в концентрации 1000 ppm, следует понимать, что концентрация белка, представляющего интерес, в 1000 раз превышает концентрацию НСР; если НСР присутствует в концентрации 100 ppm, концентрация белка, представляющего интерес, в 10000 раз превышает концентрацию НСР; и так далее.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается какими-либо из базы данных(баз данных), клетки-хозяина(клеток-хозяев), средства, денатурирующего белок(средств, денатурирующих белок), средства, алкилирующего белок(средств, алкилирующих белок), средства, восстанавливающего белок(средств, восстанавливающих белок), прибора(приборов), используемого(используемых) для идентификации, или хроматографического способа(хроматографических способов), и любое из базы данных(баз данных), клетки-хозяина(клеток-хозяев), средства, денатурирующего белок(средств, денатурирующих белок), средства, алкилирующего белок(средств, алкилирующих белок), средства, восстанавливающего белок(средств, восстанавливающих белок), прибора(приборов), используемого(используемых) для идентификации, или хроматографического способа(хроматографических способов) можно выбрать любыми подходящими способами.

Различные публикации, включая патенты, заявки на выдачу патента, опубликованные заявки на выдачу патента, номера доступа, технические статьи и научные статьи цитируются по всему описанию. Каждая из этих цитируемых ссылок включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

Данное изобретение станет более понятным из следующих примеров. Однако они никоим образом не должны истолковываться как ограничивающие объем данного изобретения.

ПРИМЕРЫ

Материалы. Все химические реагенты были высокой степени чистоты и получены от коммерческих источников. Растворители для хроматографии были категории LCMS от Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс). Моноклональное антитело и белки CHO, используемые в образцах с добавленным белком, были получены в собственной лаборатории. Дитиотреитол (DTT) и трис-(2-карбокситил)фосфин гидрохлорид (TCEP) были приобретены у Thermo Fisher Scientific. Моноклональное антитело NIST в качестве стандарта, RM 8671, разработанное в Национальном институте стандартов и технологий (Гейтерсберг, Мэриленд), было получено от Sigma-Aldrich.

Подготовка образцов с добавленным белком. *Образцы с добавленным PLBL2:* Аликвоту 1 мкг рекомбинантного фосфолипаза В-подобного белка 2 китайского хомячка (PLBL2, UniProt ID: G3I6T1, полученный Regeneron) добавляли в образец с 10 мг моноклонального антитела в качестве лекарственного вещества (mAb 1 DS) в концентрации 10 мг/мл без предварительного количественного определения PLBL2 с получением стокового раствора образца с добавленным 100 ppm PLBL2. Затем стоковый раствор разбавляли с использованием 10 мг/мл mAb1 DS с получением образцов с добавленным 50 ppm, 30 ppm, 20 ppm и 10 ppm PLBL2.

Серийные разведения множества добавленных белков CHO: В общей сложности 18 рекомбинантных белков клетки-хозяина сначала разбавляли и смешивали до достижения 1 нмоль/мл для каждого белка. Первый уровень (уровень 1) готовили путем доведения mAb DS до концентрации 10 мг/мл и добавления смеси рекомбинантных НСР к 1% количества DS (моль: молярное соотношение) до достижения общего объема 200 мкл. С уровня 2 по уровень 7 готовили с использованием метода серийного разведения 1:3 (50 мкл предыдущего уровня и 100 мкл 10 мг/мл mAb DS).

Прямое расщепление NIST mAb. Аликвоту образца с добавленным белком с количеством DS 200 мкг и NIST mAb (RM8671) высушивали с использованием SpeedVac, затем восстанавливали с помощью 20 мкл денатурирующего/восстанавливающего буфера, содержащего 8 М мочевины и 10 мМ дитиотреитол (DTT). Белки денатурировали и восстанавливали при 37 °С в течение 30 мин, а затем инкубировали с 2 мкл 500 мМ йодацетамидом в течение 30 мин в темноте. Алкилированные белки расщепляли с использованием 100 мкл 0,1 мкг/мкл трипсина при 37 °С в течение 4 часов. Смесь пептидов подкисляли 10 мкл 20% муравьиной кислоты. Концентрация подвергнутых расщеплению образцов составляла около 1,51 мкг/мкл белкового эквивалента.

Автоматизированный итеративный LC-MS/MS-анализ. Образцы анализировали с использованием системы Agilent 6545XL AdvanceBio LC/Q-TOF. LC-разделение выполняли на колонке Waters CSH (2,1 × 150 мм, 1,7 мкм) со скоростью потока 0,4 мл/мин при 60 °С с использованием 60-минутного LC-способа на Agilent Infinity II UHPLC. Буфер подвижной фазы состоит из 0,1% FA в воде (буфер А), а буфер для элюции состоит из 0,1% FA ацетонитрила (ACN) (буфер В). Пептиды элюировали на протяжении 50 минут линейным градиентом 3%-54% буфера В через пять минут после введения. Второй изократический насос с линией разделения 1:100 использовали для

подачи стандартного раствора с известными массами для калибровки в реальном времени со скоростью 0,25 мл/минута (подача в источник ионов 2,5 мкл/минута). Источник ионов представлял собой источник Agilent Dual Jet Steam ESI для одновременного распыления LC-элюата и стандартного раствора с известными массами. Температуру сушильного газа источника устанавливали на 290 °С, а скорость составляла 13 л/минута. Параметры для оболочечного газа были установлены на 275 °С и 12 л/минута. Газ-распылитель был установлен на 35 фунтов/кв. дюйм. При настройке параметров сбора данных MS первые 3 минуты раствор из LC направлялся в отходы. Начиная с третьей минуты, диапазон масс MS1 был установлен на 300-1700 m/z со скоростью сбора данных 10 спектров/секунда. Для MS/MS был установлен диапазон 50-1700 m/z со скоростью сбора данных 3 спектра/секунда. Для MS/MS было установлено узкое окно выделения ионов (~1,3 m/z). Режим сбора данных был установлен на итеративную MS/MS с допустимой погрешностью массы 15 ppm и исключением по допустимому отклонению времени удержания от -0,2 мин до +0,4 мин. Каждый образец вводили три раза в количестве 24 мкл, с использованием каждый раз итеративного способа MS/MS.

QE Plus LC-MS/MS-анализ. Образцы анализировали с использованием системы Thermo Q Exactive Plus. LC-разделение выполняли на колонке Waters CSH (2,1 × 150 мм, 1,7 мкм) со скоростью потока 0,25 мл/минута при 60 °С с использованием 120-минутного LC-способа на Waters Acuity UPLC. Буфер подвижной фазы состоит из 0,1% FA в воде (буфер А), а буфер для элюции состоит из 0,1% FA ацетонитрила (ACN) (буфер В). Пептиды элюировали на протяжении 90 минут линейным градиентом 3%-54% буфера В через пять минут после введения. Источник ионов представлял собой стандартный источник HESI. Температуру нагревателя пробоотборника устанавливали на 250 °С. Температуру капилляра устанавливали на 350 °С и оболочечный газ был установлен на 40 единиц. RF-уровень S-линз был установлен на 50. При настройке параметров сбора данных MS первые три минуты раствор из LC направлялся в отходы. В способе DDA используется способ сбора данных через каждые 10 спектров (Top 10). Диапазон MS1-сканирования был установлен на диапазон 200-2000 m/z. Для MS/MS было установлено окно выделения ионов 3 m/z и NCE был установлен на 27. Минимальное целевое значение AGC было установлено на 1e3. Каждый образец вводили три раза при 24 мкл каждый раз.

Тест надежности прибора. В общей сложности 10 мг mAb1 в 50 аликвотах (каждая 200 мкг) расщепляли с использованием протокола прямого расщепления, как описано выше, в 96-луночном планшете. Все продукты расщепления были объединены в один флакон, а затем разделены на аликвоты по 500 мкл, и их хранили при -80°С для свежего введения каждый день. Прогоны введения осуществлялись с использованием автоматизированного итеративного способа сбора данных MS/MS. В общей сложности 16 аликвот продуктов расщепления завершали за 25 дней всего с 312 введениями и прогонами LC-MS/MS.

Анализ данных. Файлы с первичными данными обрабатывали с использованием Yuonic от Protein Metrics Inc. Для файлов с первичными данными проводили поиск по базе

данных Uniprot в отношении белка СНО K1, которая была объединена с последовательностями белка mAb с использованием Byonic. Что касается NIST mAb, для поиска использовали базу данных UniprotKB мыши без дублирующейся вводной информации. Параметры поиска включали полуспецифическое расщепление трипсином, до двух пропущенных расщеплений, допустимую массу предшественника 20 ppm, допустимую массу фрагмента 30 ppm, фиксированное алкилирование по цистеину, переменное окисление метионина и дезамидирование аспарагина. Файлы результатов Byonic были импортированы в Byomics и Skyline для дальнейшего детального анализа меньшего набора белковых последовательностей и для составления отчетов о результатах. Минимальная оценка 350 для поиска MS2 использовалась для фильтрации пептидов.

Пример 1. Сигнал и предел насыщения колонки

Основной проблемой при идентификации и количественном определении НСР с помощью масс-спектрометрии является комплексная характеристика большого и разнообразного набора НСР с очень малой распространенностью наряду с доминирующим присутствием лекарственного вещества (Doneanu et al., 2015, Anal Chem, 87:10283-10291; Schenauer et al., 2012, Anal Biochem, 428:150-157). Чтобы точно определить отдельные пептиды НСР в смеси лекарственных пептидов, LC-MS/MS с направленным анализом данных (DDA) служит основной стратегией для первоначальной идентификации пептидов и белков для большинства способов LC-MS. Однако, способы DDA на основе интенсивности по своей природе имеют некоторые ограничения для идентификации белков с большим динамическим диапазоном распространенности. Ограничение связано с тем, что имеет место ограниченное число предшественников, выбранных для MS2-сканирования после каждого MS1-сканирования. Кроме того, эффект ионного заполнения большинства масс-спектрометров с ионными ловушками ограничивает время накопления ионов в случае ионов с малой распространенностью в присутствии других сильно преобладающих ионов при заданном общем числе ионов и автоматическом выборе числа уловленных ионов, как показано на ФИГ. 1. В результате сигнал от ионов пептида НСР с низким содержанием, совместно элюирующихся с лекарственными пептидами с высоким содержанием, подавлялся (ФИГ. 1А), и не мог быть эффективно захвачен при MS1 и, следовательно, не мог быть выбран для фрагментации для MS2. Кроме того, подавление сигнала от иона пептидами с высоким содержанием также является ограничением сигнала для точного количественного определения с использованием спектров MS1.

Как альтернатива масс-анализатору на основе ионной ловушки, времяпролетные (TOF) масс-анализаторы обеспечивают линейную и простую стратегию накопления ионов и сбора данных, которая является менее смещенной в отношении ионов с малой распространенностью при сборе данных полного MS1-сканирования. Согласно данному документу, использовали систему Agilent 6545XT AdvanceBio Q-TOF, которая обеспечивает новый способ сбора данных итеративной MS/MS для рабочего процесса НСР-АИМС с целью улучшения идентификации ионов-предшественников пептидов НСР с

малой распространенностью. Используя этот способ, образец расщепленного белка подвергали множественному введению в систему LC-MS/MS и анализу. Первый анализ выполняли как стандартный прогон DDA (автоматизированная MS/MS на приборе Agilent). При последующих введениях для итеративной LC-MS/MS предшественники, которые ранее были выбраны для фрагментации для MS/MS, автоматически исключались на скользящей основе с настраиваемой допустимой погрешностью массы и исключением по допустимому отклонению времени удержания. В результате более уникальные предшественники и предшественники с малой распространенностью автоматически отобраны и исследованы с помощью LC-MS/MS, как показано на ФИГ. 2.

Анализатор TOF также позволяет получать умеренные уровни насыщения сигнала от ионов доминирующего пептидного лекарственного вещества, не жертвуя получением ионов пептидов НСР с малой распространенностью. В результате повышение количества вводимого образца приведет к повышению распространенности ионов пептида НСР, что облегчит их идентификацию и количественную оценку. Колонку ID Waters CSH на 2,1 мм использовали для тестирования фактического предела насыщения системы из-за повышения вводимого количества. Колонка Waters CSH широко используется в анализе LC-MS/MS благодаря ее высокой емкости загрузки и исключительной способности к разделению, которая не ухудшается при высокой загрузке образца или при использовании MS-совместимой муравьиной кислоты в подвижной фазе. На ФИГ. 3, вводимые количества, начиная с 30 мкг расщепленного белка, тестировали для определения предела насыщения системы. Насыщение сигнала от детектора наиболее интенсивных массовых пиков началось при введении 30 мкг, как указано звездочкой на ФИГ. 3А. При извлечении хроматограмм с основными пиками, хроматографические пики пептидов, являющихся лекарственным веществом, с наиболее высокой интенсивностью были в форме плато вместо ожидаемой гауссовой формы пика, что дополнительно указывало на насыщение сигнала, показанное на ФИГ. 3В. Несмотря на то, что насыщение сигнала наблюдалось, начиная с 30 мкг для самых распространенных пептидов, интенсивность пика пептида с малой распространенностью значительно увеличивалась, как показано, например, для пика на 27 мин на ФИГ. 3В. Значения площади пика извлеченных массовых пиков с разной относительной распространенностью достигали максимума при 40 мкг, как показано на ФИГ. 3С, что указывает на емкость загрузки образца для колонки приблизительно 40 мкг.

Пример 2. Идентификация добавленных НСР в образцах лекарственного вещества.

Единичное добавление *НСР в различных уровнях*: Для оценки идентификации НСР с использованием способа НСР-AIMS и условий LC, установленных выше, сначала был проведен тест единичного добавления НСР. В этом тесте известное количество рекомбинантного белка PLBL2 китайского хомячка добавляли в не содержащий PLBL2 образец mAb в качестве лекарственного вещества (DS). Были проанализированы три повторные введения каждого образца с итеративно созданным списком исключений для каждого введения, как описано в предыдущем разделе. Как показано на ФИГ. 4, для серии

10~50 ppm (или нг НСР на мг DS) образцов с добавленным белком PLBL2, идентификация белка PLBL2 была подтверждена начиная с одного повтора образцов с добавлением 20 ppm до идентификации при множественных повторах для образцов с добавлением 30 ppm и 50 ppm (показано в виде вертикальной полосы с отмеченным ID). Для количественного определения можно использовать быстрое извлечение из площади пика MS1. Хотя формы пика целевого пептида на уровне 10 ppm может быть недостаточно для точного количественного определения, хроматограммы выделенных ионов (EIC) показывают, что MS1-хроматограмма ионов может быть извлечена как убедительное доказательство обнаружения.

Серийные разведения множества НСР: Для дальнейшей оценки чувствительности способа в большом наборе белков готовили другой набор образцов с добавленным белком, состоящий из 18 рекомбинантных распространенных белков клетки-хозяина, как показано в таблице 1. Все из этих белков добавляли в раствор mAb в качестве лекарственного вещества при 1000 ppm в качестве образца уровня 1. Расчет ppm, используемый в данном случае, отмеченный звездочками, производился в молярном отношении с целью лучшего отображения популяции молекулярных ионов, измеряемой с помощью масс-спектрометрии, и с целью согласования с другими количественными определениями в ppm в разделах ниже. По сравнению с массовым отношением, которое обычно используется, для того же уровня НСР значение молярного отношения обычно больше, чем значение массового отношения, когда размер белка невелик (таблица 1). Серийное разведение 1:3 выполняли с использованием уровня 1 для mAb в качестве лекарственного вещества с получением серии образцов с различной распространенностью добавленных белков (от уровня 2, 333 ppm, до уровня 7, 1,4 ppm). По сравнению с идентификацией в один прогон на Q Exactive Plus, где предел идентификации большинства белков находится на уровне 3, 111,1 ppm (таблица 3), с использованием прибора TOF с умеренным насыщением сигнала предел идентификации может достигать следующего уровня, уровня 4, 37 ppm, для некоторых из белков или некоторых отдельных пептидов этих белков (таблица 2). При повторных введениях итеративной MS/MS число уникальных пептидов, идентифицированных из большинства уровней, увеличивается, и большее количество белков находится на пределе идентификации на уровне 4, 37 ppm, с идентификацией отдельных пептидов вплоть до следующего уровня, уровня 5, 12,3 ppm. При преобразовании числа в массовое отношение в ppm, для уровня 4, значения ppm составляют 20~30 ppm (таблица 1).

Таблица 1. Массовое отношение в значениях ppm, соответствующее каждому уровню молярного отношения.

Номер доступа	Уровни разведения		Уровень 1	Уровень 2	Уровень 3	Уровень 4	Уровень 5	Уровень 6	Уровень 7
	Название белка	MW	1000*	333,3*	111,1*	37*	12,3*	4,1*	1,4*
G3GZB2	Кислая церамидаза	42 кДа	562,0	187,3	62,4	20,8	6,9	2,3	0,8
G3I5L3	Аннексин	35 кДа	478,2	159,4	53,1	17,7	5,9	2,0	0,7
G3HYN7	Бета-гексозаминидаза	57 кДа	766,1	255,3	85,1	28,3	9,4	3,1	1,1
G3H8V5	Карбоксипептидаза	51 кДа	687,4	229,1	76,4	25,4	8,5	2,8	1,0
G3H0L9	Катепсин В	34 кДа	462,5	154,1	51,4	17,1	5,7	1,9	0,6
G3I4W7	Катепсин D	41 кДа	555,0	185,0	61,7	20,5	6,8	2,3	0,8
G3INC5	Катепсин L1	34 кДа	460,6	153,5	51,2	17,0	5,7	1,9	0,6
Q9EPP7	Катепсин Z	31 кДа	419,9	140,0	46,7	15,5	5,2	1,7	0,6
G3HNY3	Кластерин	48 кДа	653,0	217,7	72,6	24,2	8,0	2,7	0,9
G3GUR1	Субкомпонент C1r-A системы комплемента	68 кДа	910,8	303,6	101,2	33,7	11,2	3,7	1,3
A4URF0	Хемокин с мотивом C-X-C	8 кДа	111,0	37,0	12,3	4,1	1,4	0,5	0,2
G3IKC3	Глутатион-S-трансфераза мю-6	69 кДа	931,6	310,5	103,5	34,5	11,5	3,8	1,3
G3H6V7	Липопротеинлипаза	47 кДа	637,7	212,6	70,9	23,6	7,8	2,6	0,9
G3HQY6	Лизосомная кислая липаза	43 кДа	573,8	191,2	63,7	21,2	7,1	2,4	0,8
G3IYN0	Ингибитор 1 металлопротеиназы	19 кДа	265,5	88,5	29,5	9,8	3,3	1,1	0,4
G3H533	Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза	20 кДа	279,3	93,1	31,0	10,3	3,4	1,1	0,4
G3IYB1	Сиалат-О-ацетилэстераза	58 кДа	784,5	261,5	87,2	29,0	9,6	3,2	1,1
G3I4M9	Транстиретин	13 кДа	177,3	59,1	19,7	6,6	2,2	0,7	0,2

Таблица 2. Количества уникальных пептидов, идентифицированных с помощью автоматизированной MS/MS и итеративной MS/MS для каждого добавленного белка при различных уровнях разведений (показано как автоматизированная MSMS /итеративная MS/MS).

	Уровни разведений (ppm)	Уровень 1	Уровень 2	Уровень 3	Уровень 4	Уровень 5	Уровень 6	Уровень 7
Номер доступа	Название белка	1000	333,3	111,1	37	12,3	4,1	1,4
G3GZB2	Кислая церамидаза	10/26	8/15	3/7	0/1			
G3I5L3	Аннексин	10/28	6/17	2/9	0/3			
G3HYN7	Бета-гексозаминидаза	8/28	6/20	4/8	3/4			
G3H8V5	Карбоксипептидаза	7/20	6/13	1/2				
G3H0L9	Катепсин В	8/20	4/10	1/3				
G3I4W7	Катепсин D	6/21	3/11	4/8	2/4			
G3INC5	Катепсин L1	4/13	2/5	2				
Q9EPP7	Катепсин Z	4/13	3/7	1/3	1/3	0/1		
G3HNJ3	Кластерин	6/21	3/10	3/6	1/3			
G3GUR1	Субкомпонент C1г-А системы комплемента	8/38	9/25	5/10	0/2	0/1		
A4URF0	Хемокин с мотивом C-X-C	1/7	1/4	1/1	1/1			
G3IKC3	Глутатион-S-трансфераза мю-б	22/50	12/20	1/1	0/1	0/1		
G3H6V7	Липопротеинлипаза	2/5	3/4					
G3HQY6	Лизосомная кислая липаза	9/13	3/5					
G3IBH0	Ингибитор 1 металлопротеиназы	4/8	1/3	1/3	1/2			

G3H533	Пептидил-пролил- цис/транс-изомераза	5/18	3/13	3/6	0/1			
G3IB1	Сиалат-О- ацетилэстераза	12/21	3/15	4/8	2/2			
G3I4M9	Транстиретин	5/6	0/1					

Таблица 3. Количества уникальных пептидов, идентифицированных с помощью прогона с однократным введением на Q Exactive Plus для каждого добавленного белка при различных уровнях разведений.

Номер доступа	Уровни разведения	Уровень 1	Уровень 2	Уровень 3	Уровень 4	Уровень 5	Уровень 6	Уровень 7
	Название белка	1000	333,3	111,1	37	12,3	4,1	1,4
G3GZB2	Кислая церамидаза	17	13	4				
G3I5L3	Аннексин	8	5	2				
G3HYN7	Бета-гексозаминидаза	17	9	1				
G3H8V5	Карбоксипептидаза	9	5	1				
G3H0L9	Катепсин В	6	3	1				
G3I4W7	Катепсин D	10	8	1				
G3INC5	Катепсин L1	6	4					
Q9EPP7	Катепсин Z	6	4	4				
G3HNJ3	Кластерин	13	8	3				
G3GUR1	Субкомпонент C1r-A системы комплемента	12	12	6				
A4URF0	Хемокин с мотивом C-X-C	1	1	1				
G3IKC3	Глутатион-S-трансфераза мю-6	29	20	8				
G3H6V7	Липопротеинлипаза	4	3					
G3HQY6	Лизосомная кислая липаза	9	7	2				
G3IBN0	Ингибитор 1 металлопротеиназы	3	2					
G3H533	Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза	9	7	3				
G3IB1	Сиалат-О-ацетилэстераза	9	6	1				
G3I4M9	Транстиретин	6	3	1				

Взаимосвязь между числом пар спектр-пептид (PSM) для 3 повторов обычной автоматизированной MS/MS и итеративной MS/MS показана на ФИГ. 5А и ФИГ. 5В соответственно. По сравнению с обычными PSM, обнаруживаемыми при стандартных повторных прогонах с использованием автоматизированной MS/MS, имело место больше уникальных PSM, идентифицированных для каждого раунда итеративной MS/MS, что привело к более уникальным и полным идентификациям. Быстрое количественное определение с использованием площади MS1 EIC для 3 основных пептидов из каждого белка показало превосходную линейность по сравнению с добавленной концентрацией (таблица 4) с небольшими вариациями по сравнению с прогонами в трех повторях, что также подтвердило, что умеренное насыщение сигнала DS не влияло на сигналы от белков клетки-хозяина, присутствующих на низких уровнях.

Таблица 4. Линейность количественного определения с 3 основными пептидами каждого белка от уровня 1 до уровня 4 с прогонами в трех повторях.

Номер доступа	Название белка	Среднее R ²	Станд. откл. R ²
G3GZB2	Кислая церамидаза	0,9682	0,0135
G3I5L3	Аннексин	0,9641	0,0186
G3HХN7	Бета-гексозаминидаза	0,9626	0,0185
G3H8V5	Карбоксипептидаза	0,9687	0,0168
G3H0L9	Катепсин В	0,9642	0,0187
G3I4W7	Катепсин D	0,9790	0,0116
G3INC5	Катепсин L1	0,9670	0,0149
Q9EPP7	Катепсин Z	0,9766	0,0148
G3HNJ3	Кластерин	0,9671	0,0137
G3GUR1	Субкомпонент C1g-A системы комплемента	0,9579	0,0193
A4URF0	Хемокин с мотивом C-X-C	0,9727	0,0066
G3IKC3	Глутатион-S-трансфераза мю-6	0,9562	0,0125
G3H6V7	Липопротеинлипаза	0,9499	0,0226
G3HQY6	Лизосомная кислая липаза	0,9575	0,0250
G3IBH0	Ингибитор 1 металлопротеиназы	0,9665	0,0146
G3H533	Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза	0,9628	0,0192
G3IBV1	Сиалат-О-ацетилэстераза	0,9632	0,0162
G3I4M9	Транстиретин	0,9736	0,0097

Пример 3. Идентификация НСР из NIST mAb

Для дальнейшей оценки стратегии НСР-AIMS способ применяли для NIST mAb в качестве стандарта. С помощью только прямого расщепления и без этапов обогащения, подготовка образцов и сбор данных могут быть завершены за один день, при этом

требуется не более 200 мкг образца белка. HCP, идентифицированные из трех повторов автоматизированной итеративной MS/MS, показаны в таблице 5, с максимальной оценкой поиска для пептидов с наилучшими показателями, количеством PSM, числом уникальных пептидов и полуколичественным определением с использованием распространенности для пептида белка клетки-хозяина с наилучшими показателями в сравнении с таковыми для NIST mAb (молярное отношение в ppm).

Таблица 5. Идентификация и количественное определение белков в рамках прогонов автоматизированной итеративной MS/MS для NIST mAb.

Номер доступа	Описание белка	Максимальный показатель	№ PSM	№ уникальных пептидов	Количество (ppm)
P05064	Фруктозобисфосфат-альдозаза А	810,94	24	10	243
Q922R8	Белок-дисульфидизомераза А6	812,38	20	5	270,6
P05063	Фруктозобисфосфат-альдозаза С	737,69	24	11	113,7
P06745	Глюкозо-6-фосфат-изомераза	538,77	5	3	67,6
P01887	Бета-2-микроглобулин	407,4	4	1	86,5
Q99KN9	Белок 1, взаимодействующий с клатрином	66,17	1	1	8,4
Q8K4F5	Белок АВНD11	221,27	3	3	9,2
Q9EPX2	Папилин	272,61	5	2	N/A
Q91YR9	Простагландинредуктаза 1	169,04	1	1	N/A
P08101	Низкоаффинный рецептор II Fc-области иммуноглобулина гамма	326,73	4	2	43,6
Q03173	ENAH, регулятор актина	52,82	1	1	N/A
P45878	Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза FKBP2	352,61	4	1	50,5

*(N/A показывает, что количественное определение на уровне MS1 недоступно)

По сравнению с описанным ранее микроструйным онлайн 2D-LC способом (Doneanu et al.) и способом с подготовкой образцов с помощью нативного расщепления (Doneanu et al.; Huang et al., 2017, Anal Chem, 89:5436-5444), способ HCP-AIMS охватывает все общие HCP из двух предыдущих исследований с приблизительным пределом обнаружения 10 ppm, при этом несколько белков были идентифицированы в диапазоне 2-3 ppm (массовое отношение). По сравнению с микроструйным онлайн 2D-LC способом, который включал фракционирование и множественные микроструйные прогоны с общим временем прогона 500 минут, в способе HCP-AIMS используется более надежная колонка 2,1 мм ID и стабильный аналитический поток с временем прогона всего

180 минут для трех повторов. Было показано, что способ с нативным расщеплением является очень чувствительным способом, и с его помощью можно достичь предела идентификации вплоть до однозначных уровней ppm (Huang et al.). Однако, для указанного способа требуется относительно большее количество DS-образцов (1 мг или больше) для эффективного накопления достаточного количества НСР (Huang et al.). Кроме того, высокотемпературный нагрев, центрифугирование и, в некоторых случаях, фильтрация будут ограничивать его развитие в сторону высокопроизводительного анализа и количественного анализа за один прогон.

Подобно образцу с добавлением белка, PSM НСР для трех повторов прогона итеративной MS/MS показали большое число новых уникальных PSM в каждом последующем повторе, как показано на ФИГ. 6. Также показано снижение числа PSM при третьем повторе. Что касается папилина, простагландинредуктазы 1 и ENAH, регулятора актина, хотя они и были идентифицированы при белковом поиске, из-за низкого количества уникальных пептидов и крайне ограниченного числа MS1-сканирований в итеративном прогоне, не удалось выделить пики на хроматограмме для надежного количественного определения.

Пример 4. Оценка надежности

Для удовлетворения требованиям НСР-анализа при разработке лекарственного средства и обеспечения устойчивой и надежной идентификации и количественного определения НСР для большого набора образцов в условиях высокопроизводительного анализа, надежность НСР-AIMS-анализа и стабильность работы прибора являются крайне важными, особенно при ежедневном введении продуктов расщепления белков в высоких дозах. С этой целью был выполнен тщательный тест для оценки нескольких ключевых факторов, таких как интенсивность сигнала, время удержания и погрешность массы, которые необходимы для поддержания эффективности и надежности рабочего процесса НСР-AIMS. Для обеспечения согласованности и высокой точности теста надежности тестируемый образец mAb DS расщепляли в большом количестве, затем объединяли и делили на аликвоты в однодневном объеме введений для 20 введений. В течение 3 последовательных недель аликвоту брали из хранилища с температурой -80°C и вводили для тестирования. Репрезентативные пептиды с вариацией интенсивности на четыре порядка экстрагировали для мониторинга показателей надежности, как показано на ФИГ. 7 и в таблице 6. Даже при изменениях растворителей и накоплении солей на переднем источнике ионов, площадь пика для большинства пептидов остается относительно стабильной на протяжении 300 введений, с $<30\%$ коэффициентом вариации (CV) для основной части пептидов. Из-за большого объема прямого введения с течением времени некоторые ранние пики элюирования (например, гликопептиды) были не такими стабильными, как другие пептиды, с более высоким отклонением и максимальной разницей в соседних прогонах. Время удержания на протяжении 300 введений было одинаковым почти для всех пептидов, с очень хорошей стабильностью времени удержания в соседних прогонах. Насыщение некоторых пиков DS-пептида (Per1-3) будет

влиять на точность определения массы из-за искажения статистики ионов, отражающего погрешность массы в положительную сторону. В то же время другие пептиды сохраняли высокую точность определения массы для уверенной идентификации. Кроме того, даже при использовании методики шести сигм диапазон погрешности массы не превышал диапазон ~ 7 ppm.

Таблица 6. Обобщенные данные статистического анализа показателей надежности для 9 пептидов.

Пептид	Площадь пика MS1		Время удержания (мин)					Погрешность массы предшественника (ppm)		
	Средняя площадь	Площадь %CV	Верхнее значение 95% доверительного интервала для среднего	Нижнее значение 95% доверительного интервала для среднего	Средняя дельта	Станд. откл.	Максимальная вариация от прогона к прогону	Средняя погрешность массы	Станд. откл.	Диапазон 6σ
Peр1	1,32E+09	8,1	37,288	37,252	0,036	0,159	0,22	1,93	0,47	(0,52, 3,34)
Peр2	6,12E+08	12,8	34,035	34,002	0,033	0,143	0,10	3,00	0,42	(1,76, 4,25)
Peр3	5,11E+08	14,9	52,510	52,481	0,029	0,131	0,10	5,09	0,44	(3,77, 6,40)
Peр4	3,84E+08	7,2	19,381	19,353	0,028	0,119	0,19	0,72	0,64	(-1,20, 2,64)
Peр5	2,09E+08	24,2	24,596	24,562	0,034	0,150	0,16	1,46	0,47	(0,06, 2,85)
Peр6	4,08E+07	27,1	33,222	33,194	0,029	0,128	0,14	0,57	0,47	(-0,83, 1,98)
Peр7	2,04E+07	43,2	19,595	19,563	0,032	0,141	0,17	0,83	0,48	(-0,60, 2,27)
Peр8	4,98E+06	27,1	9,956	9,903	0,053	0,231	0,40	-1,11	0,63	(-2,99, 0,77)
Peр9	4,23E+05	20,6	6,605	6,531	0,074	0,321	1,70	-1,66	0,86	(-4,25, 0,93)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации по меньшей мере одного белка клетки-хозяина (НСР) в образце, имеющем по меньшей мере один НСР и по меньшей мере другой белок, включающий:

(a) пропускание образца через хроматографическую колонку для получения хроматографического пика элюирования;

(b) выполнение анализа на основе тандемной масс-спектрометрии, включающего цикл зависимого сканирования в процессе образования хроматографического пика элюирования (a), причем цикл зависимого сканирования включает:

(i) получение масс-спектрограммы;

(ii) отбор множества ионов-предшественников из полученной масс-спектрограммы в виде набора автоматических исключений; и

(iii) получение второй масс-спектрограммы после исключения множества из набора ионов-предшественников в наборе автоматических исключений; и

(c) использование полученных масс-спектрограмм для идентификации по меньшей мере одного НСР после прогона цикла сбора данных в течение заданного числа раз.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанное заданное число циклов равняется одному, двум, трем, четырем или более циклам.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что допустимая погрешность массы для отбора иона-предшественника для набора автоматических исключений составляет около 15 ppm.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что допустимое отклонение времени удержания для отбора иона-предшественника для набора автоматических исключений составляет от около -0,2 минуты до около +0,4 минуты.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что набор автоматических исключений также включает по меньшей мере один фоновый ион.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что набор автоматических исключений включает по меньшей мере один дополнительный ион-предшественник не из полученной масс-спектрограммы.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ионы-предшественники из полученного масс-спектра не добавляются к набору автоматических исключений, если значения их интенсивности ниже заданного порога.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что подготовка образцов включает прямое расщепление.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что подготовка образцов включает нативное расщепление.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что подготовка образцов включает иммунопреципитацию.

11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что подготовка образцов включает профилирование белков на основе активности.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что подготовка образцов включает

фракционирование.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что подготовка образцов включает фильтрацию.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматографию на комбинированных носителях или их комбинацию.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что образец содержит белок, представляющий интерес.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что концентрация белка, представляющего интерес, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 10000 раз, по меньшей мере в 100000 раз или по меньшей мере в 1000000 раз превышает концентрацию по меньшей мере одного идентифицированного НСР.

17. Способ по п. 15, отличающийся тем, что белок, представляющий интерес, представляет собой антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, Fab-область антитела, конъюгат антитело-лекарственное средство, слитый белок или лекарственное средство.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или тройной квадрупольный масс-спектрометр, причем масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

19. Способ количественного определения по меньшей мере одного белка клетки-хозяина (НСР) в образце, имеющем по меньшей мере один НСР и по меньшей мере другой белок, включающий:

(a) пропускание образца через хроматографическую колонку для получения хроматографического пика элюирования;

(b) выполнение анализа на основе тандемной масс-спектрометрии, включающего цикл зависимого сканирования в процессе образования хроматографического пика элюирования (a), причем цикл зависимого сканирования включает:

(i) получение масс-спектрограммы;

(ii) отбор множества ионов-предшественников из полученной масс-спектрограммы в виде набора автоматических исключений; и

(iii) получение второй масс-спектрограммы после исключения множества из набора ионов-предшественников в наборе автоматических исключений; и

(c) использование полученных масс-спектрограмм для количественного определения по меньшей мере одного НСР после прогона цикла сбора данных в течение заданного числа раз.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанное заданное число циклов равняется одному, двум, трем, четырем или более циклам.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что допустимая погрешность массы для отбора иона-предшественника для набора автоматических исключений составляет около 15 ppm.

22. Способ по п. 19, отличающийся тем, что допустимое отклонение времени удержания для отбора иона-предшественника для набора автоматических исключений составляет от около -0,2 минуты до около +0,4 минуты.

23. Способ по п. 19, отличающийся тем, что набор автоматических исключений также включает по меньшей мере один фоновый ион.

24. Способ по п. 19, отличающийся тем, что набор автоматических исключений включает по меньшей мере один дополнительный ион-предшественник не из полученной масс-спектрограммы.

25. Способ по п. 19, отличающийся тем, что ионы-предшественники из полученного масс-спектра не добавляются к набору автоматических исключений, если значения их интенсивности ниже заданного порога.

26. Способ по п. 19, отличающийся тем, что подготовка образцов включает прямое расщепление.

27. Способ по п. 19, отличающийся тем, что подготовка образцов включает нативное расщепление.

28. Способ по п. 19, отличающийся тем, что подготовка образцов включает иммунопреципитацию.

29. Способ по п. 19, отличающийся тем, что подготовка образцов включает профилирование белков на основе активности.

30. Способ по п. 19, отличающийся тем, что подготовка образцов включает фракционирование.

31. Способ по п. 19, отличающийся тем, что подготовка образцов включает фильтрацию.

32. Способ по п. 19, отличающийся тем, что этап хроматографии включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматографию на комбинированных носителях или их комбинацию.

33. Способ по п. 19, отличающийся тем, что образец содержит белок, представляющий интерес.

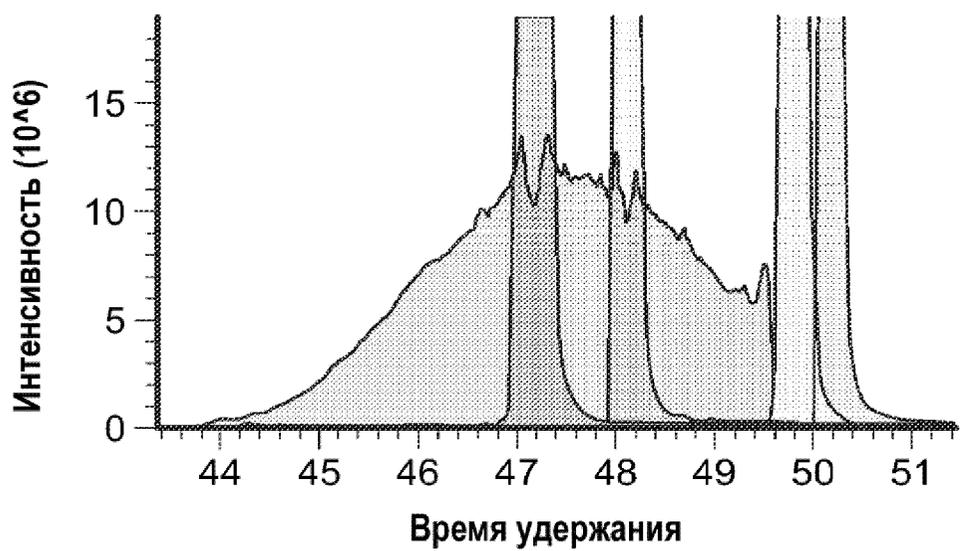
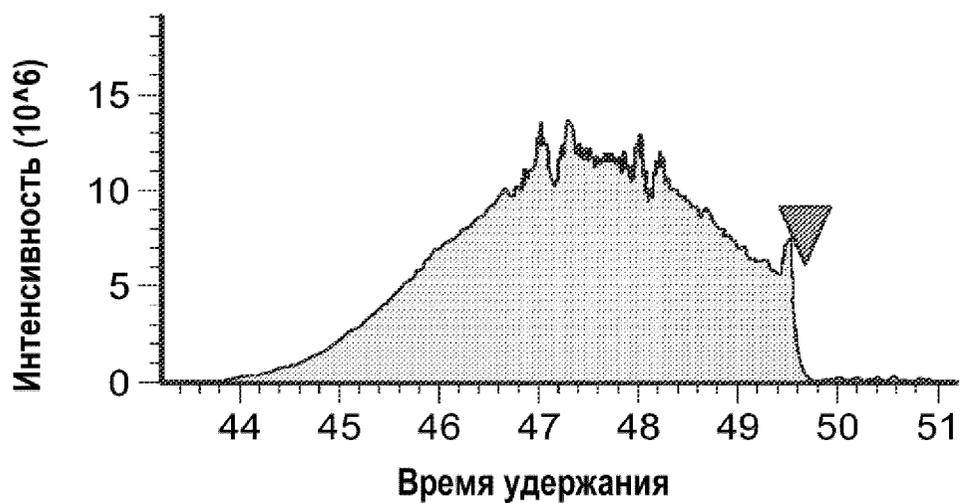
34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что концентрация белка, представляющего интерес, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 10000 раз, по меньшей мере в 100000 раз или по меньшей мере в 1000000 раз превышает концентрацию по меньшей мере одного идентифицированного НСР.

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

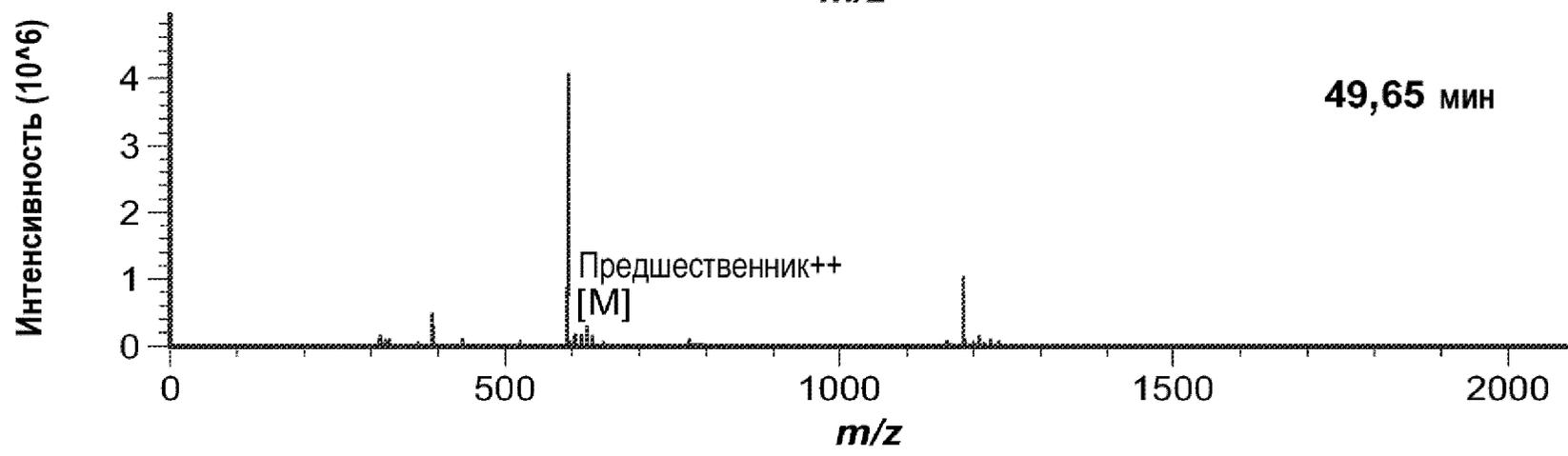
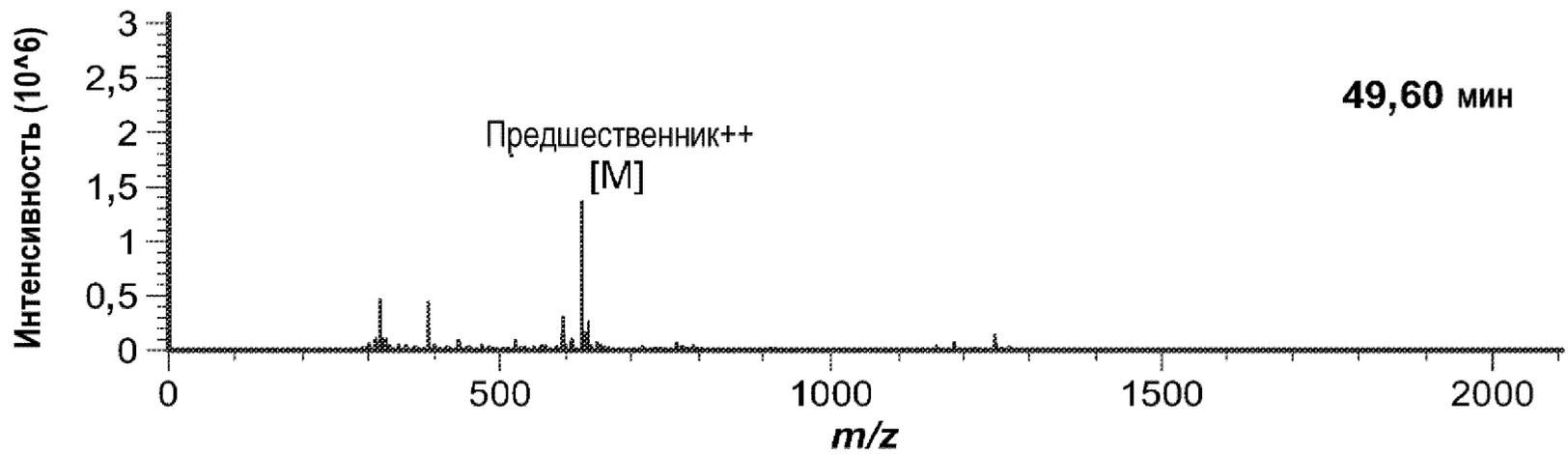
средство.

36. Способ по п. 19, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или тройной квадрупольный масс-спектрометр, причем масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

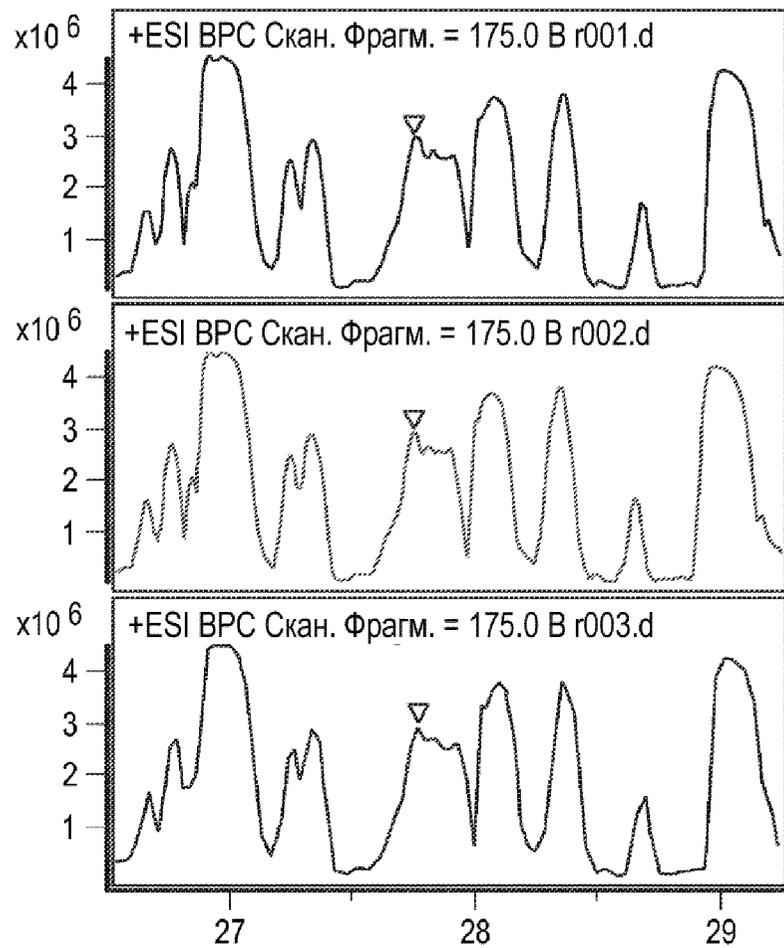
По доверенности



Фиг. 1А

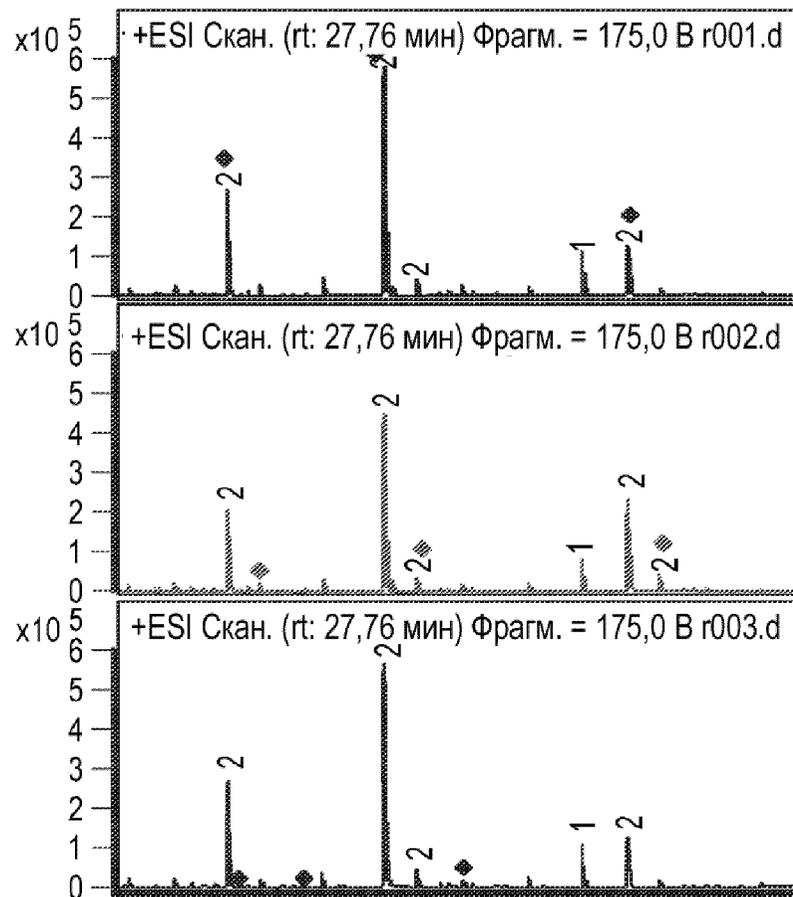


Фиг. 1В



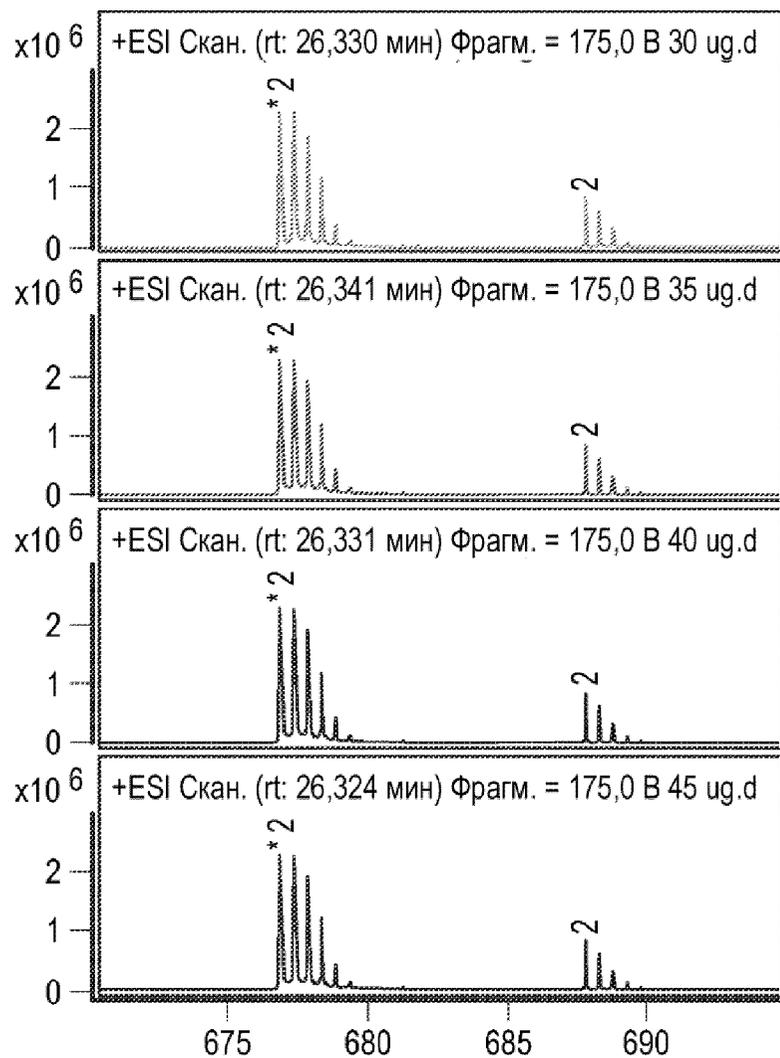
Количество в зависимости от времени сбора данных (мин)

Фиг. 2А



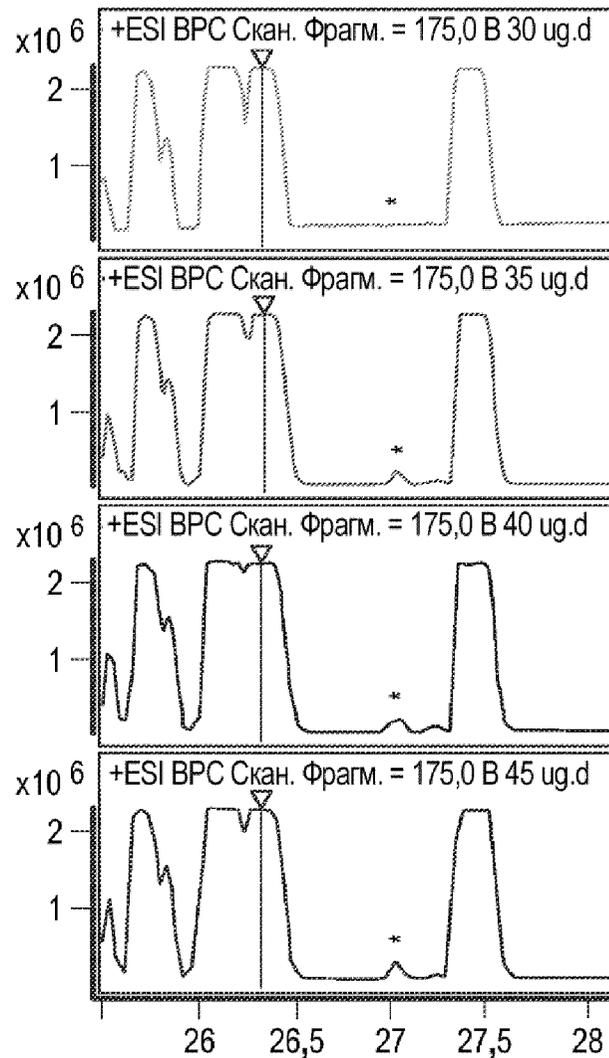
Количество в зависимости от отношения массы к заряду (m/z)

Фиг. 2В



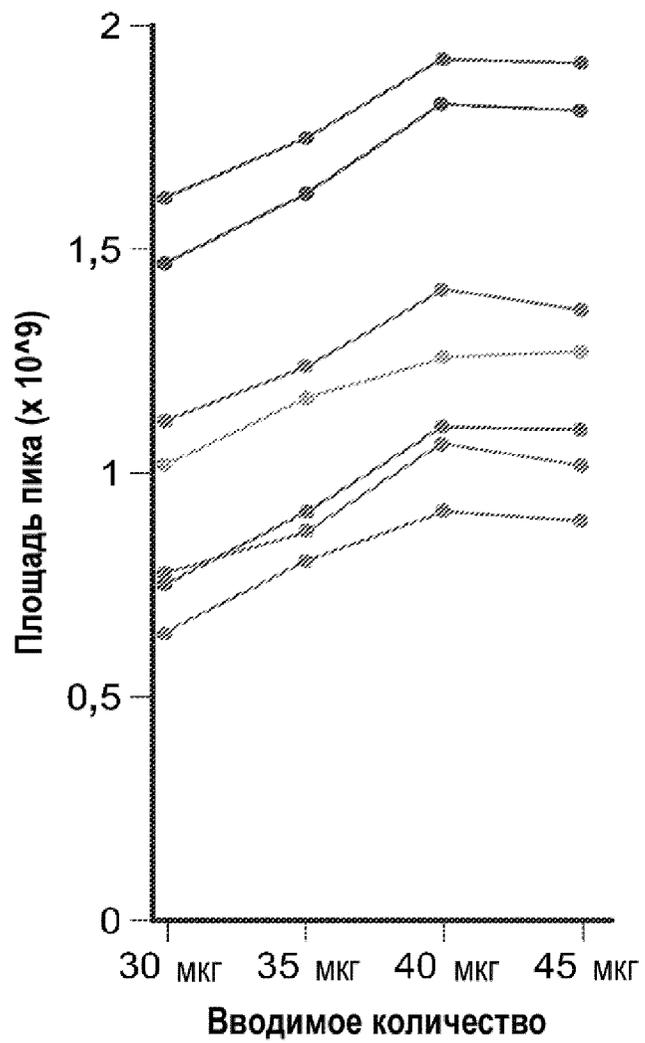
Количество в зависимости от отношения массы к заряду (m/z)

Фиг. 3А

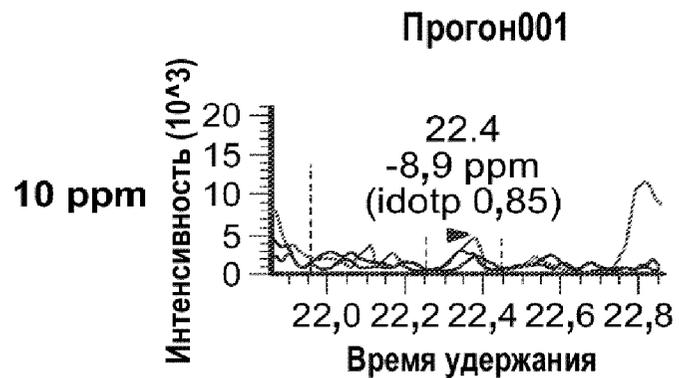


Количество в зависимости от времени сбора данных (мин)

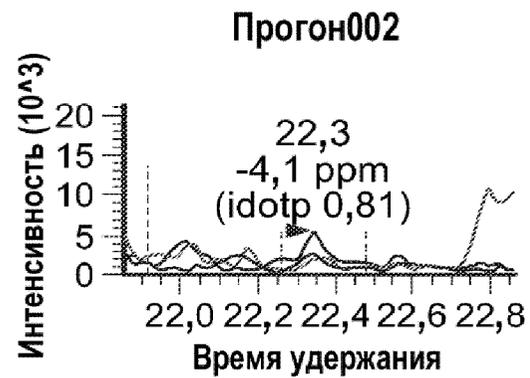
Фиг. 3В



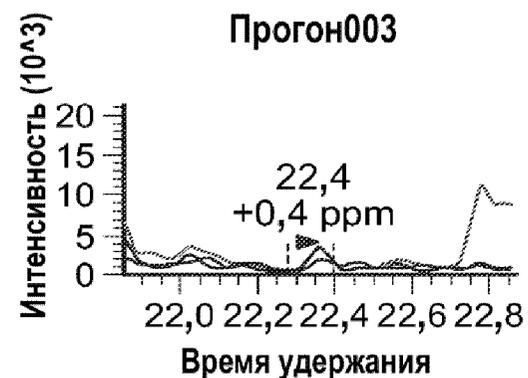
Фиг. 3С



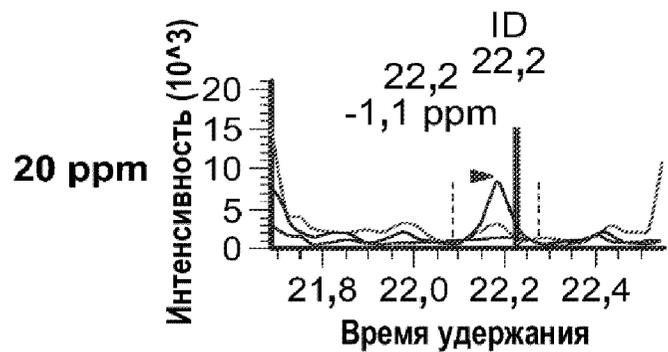
Фиг. 4А



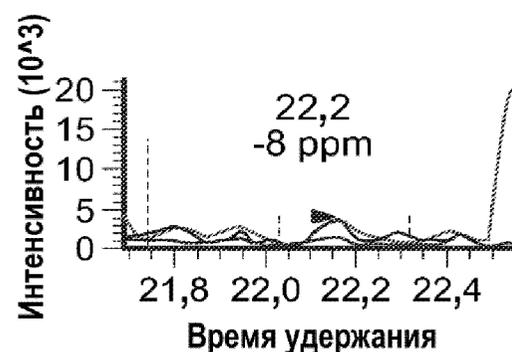
Фиг. 4В



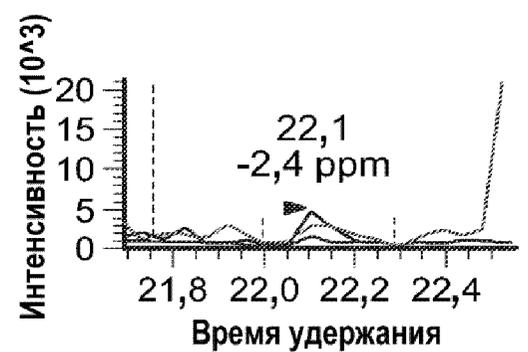
Фиг. 4С



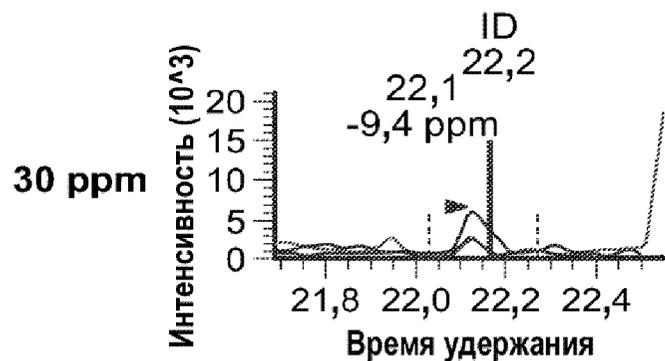
Фиг. 4D



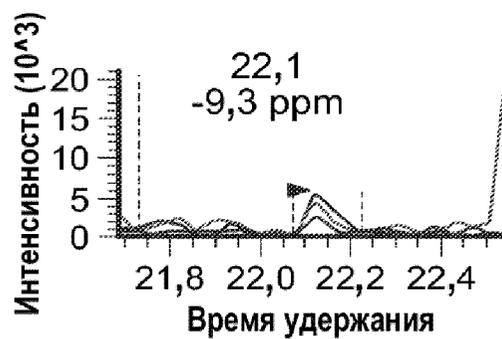
Фиг. 4Е



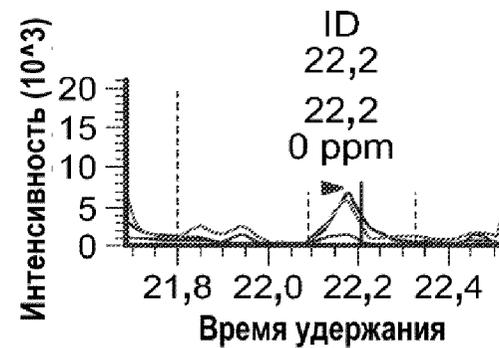
Фиг. 4F



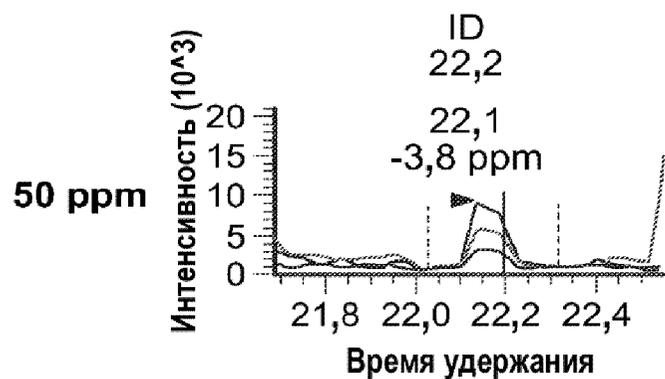
Фиг. 4G



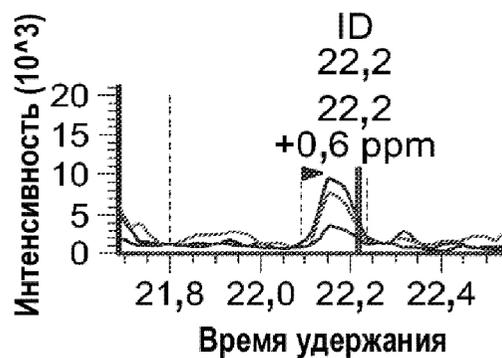
Фиг. 4H



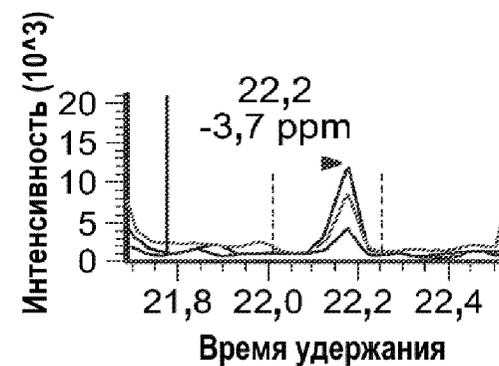
Фиг. 4I



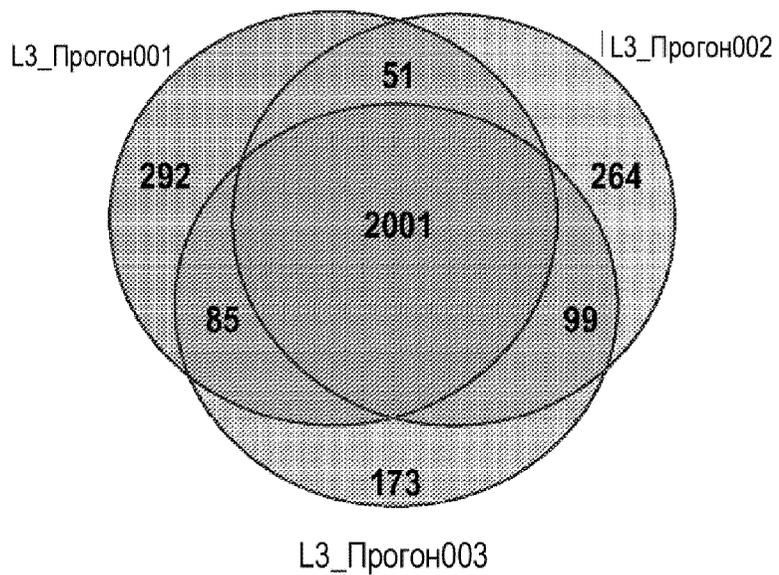
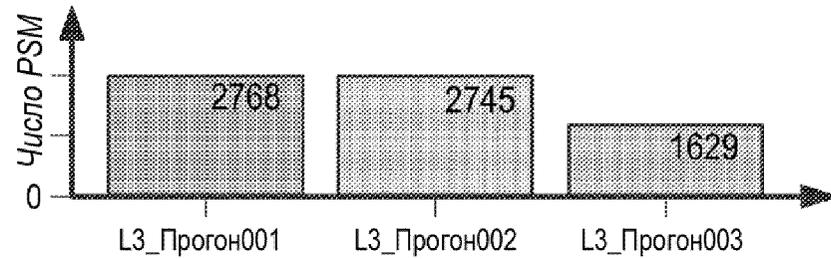
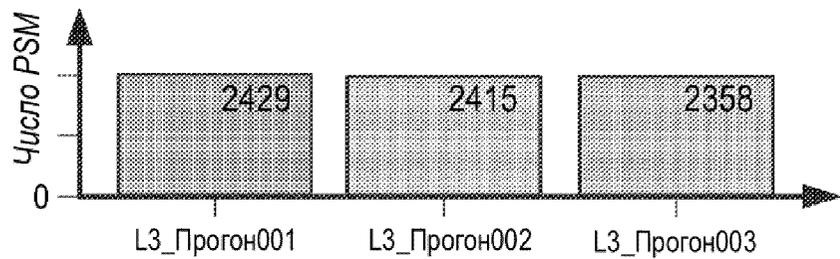
Фиг. 4J



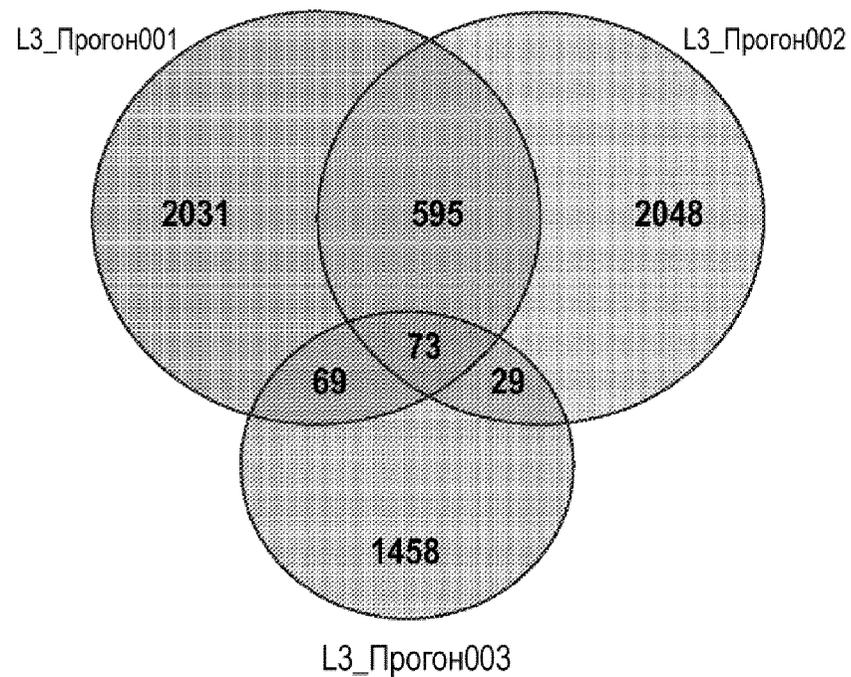
Фиг. 4K



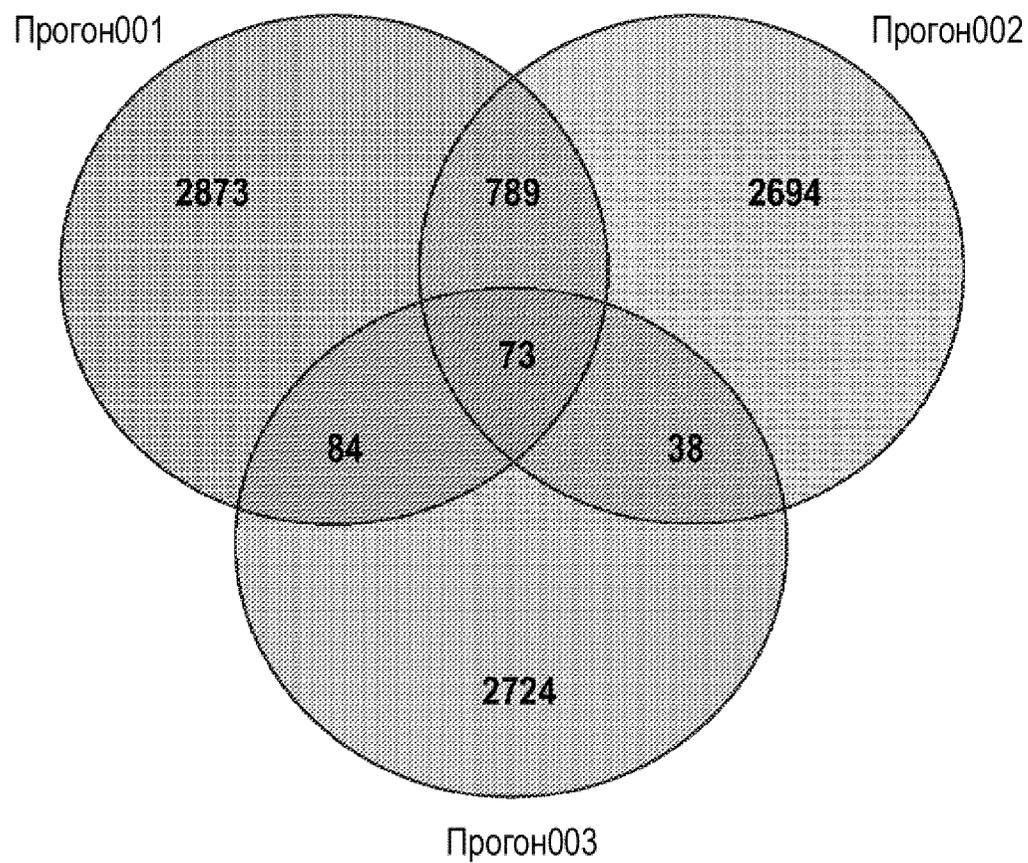
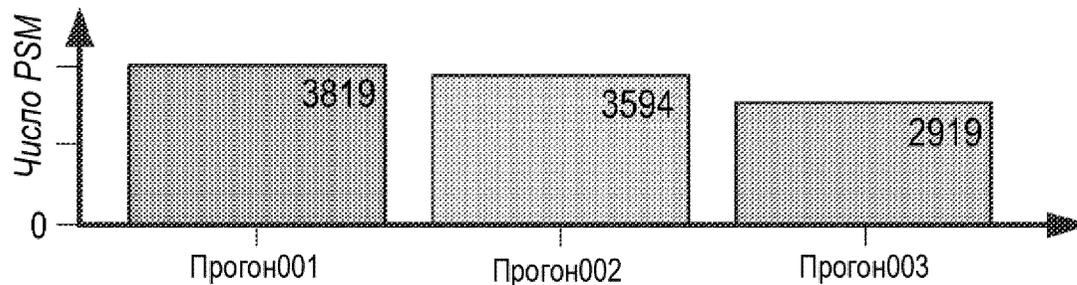
Фиг. 4L



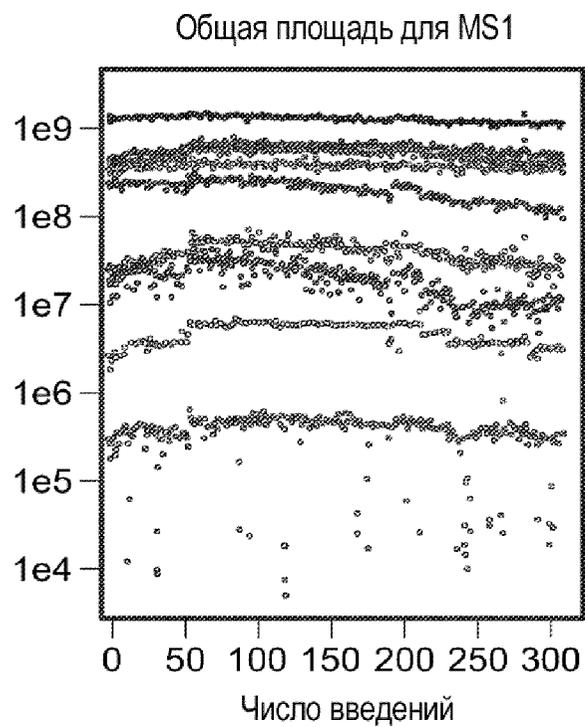
Фиг. 5А



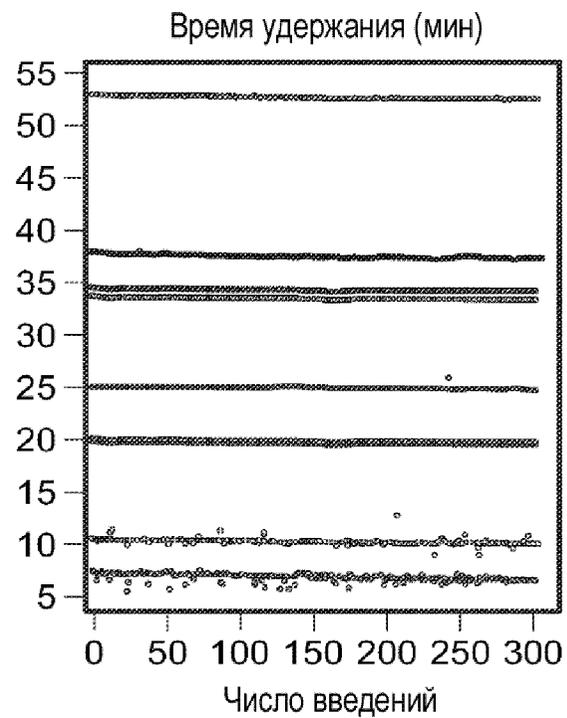
Фиг. 5В



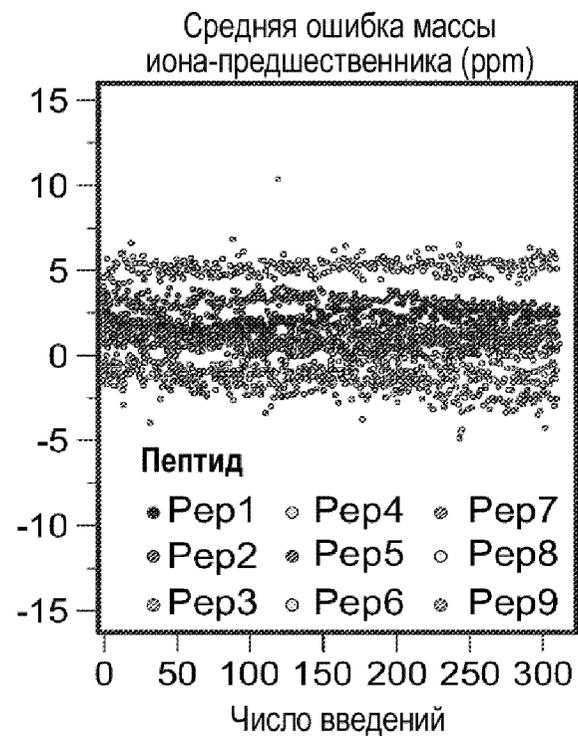
Фиг. 6



Фиг. 7А



Фиг. 7В



Фиг. 7С