

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047025**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.27

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)
G01N 30/02 (2006.01)

(21) Номер заявки
202291992

(22) Дата подачи заявки
2021.01.07

(54) **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АМИНОКИСЛОТ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ СИГНАЛА В МАСС-СПЕКТРАЛЬНОМ АНАЛИЗЕ**

(31) **62/958,366; 63/053,836**

(32) **2020.01.08; 2020.07.20**

(33) **US**

(43) **2022.10.19**

(86) **PCT/US2021/012523**

(87) **WO 2021/142137 2021.07.15**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

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

(72) Изобретатель:

**Мао Юань, Клейнберг Эндрю, Чжао
Юньлун, Го Лили (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) MAO YUAN ET AL.: "Simple Addition of Glycine in Trifluoroacetic Acid-Containing Mobile Phases Enhances the Sensitivity of Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Biopharmaceutical Characterization", ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 92, no. 13, 28 May 2020 (2020-05-28), pages 8691-8696, XP55796110, US, ISSN: 0003-2700, DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01319, the whole document

ZHAO YUNLONG ET AL.: "Glycine additive facilitates site-specific glycosylation profiling of biopharmaceuticals by ion-pairing hydrophilic interaction chromatography mass spectrometry", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 413, no. 5, 26 November 2020 (2020-11-26), pages 1267-1277, XP037373229, ISSN: 1618-2642, DOI: 10.1007/S00216-020-03089-3, the whole document

GARCIA ET AL.: "The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 825, no. 2, 25 October 2005 (2005-10-25), pages 111-123, XP027627025, ISSN: 1570-0232 [retrieved on 2005-10-25], abstract; p. 115

SHOU W Z ET AL.: "Simple means to alleviate sensitivity loss by trifluoroacetic acid (TFA) mobile phases in the hydrophilic interaction chromatography-electrospray tandem mass spectrometric (HILIC-ESI/MS/MS) bioanalysis of basic compounds", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 825, no. 2, 25 October 2005 (2005-10-25), pages 186-192, XP027627033, ISSN: 1570-0232 [retrieved on 2005-10-25], abstract

(57) Описан способ усиления сигнала масс-спектра. Способ может включать приведение образца в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образца связываться с субстратом; применение первого градиента подвижной фазы к разделительной колонке, при этом первый градиент подвижной фазы включает трифторуксусную кислоту (TFA) и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту) или муравьиную кислоту (FA) и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту); применение второго градиента подвижной фазы к разделительной колонке, при этом второй градиент подвижной фазы содержит TFA в ацетонитриле (ACN) и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту) или муравьиную кислоту (FA) в ACN и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту); и проведение масс-спектрометрического анализа элюированных компонентов образца.

B1**047025****047025 B1**

Ссылка на перечень последовательностей

Данная заявка включает в себя в качестве ссылки перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10675WO01-Sequence.txt, созданный 7 мая 2021 г. и содержащего 18,878 байта.

Область изобретения

Данное изобретение относится к масс-спектральному анализу и относится к способам усиления сигнала масс-спектрометрии за счет использования аминокислот, таких как глицин, или модифицированных аминокислот.

Уровень техники

Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ-МС) используется для характеристики биомолекул, включая пептидные и белковые терапевтические средства. Хотя ЖХ-МС является мощной технологией для характеристики рекомбинантных белков и пост-трансляционных, и белковых модификаций, таких как дисульфидные связи, гликозилирование и фосфорилирование, было обнаружено, что разделение и чувствительность недостаточны. Например, гликозилирование можно охарактеризовать на пептидном уровне путем анализа гликопептидов, полученных в результате расщепления антитела трипсином. Однако гликопептиды, имеющие гетерогенные гликоформы, часто плохо отделяются с помощью жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RPLC), которая традиционно используется для картирования пептидов. В дополнение, интерактивная масс-спектрометрия (МС), индуцированная фрагментацией сахарной цепи в гликопептидах в источнике, может вызывать артефакты укороченной гликоформы, которые ставят под угрозу точную количественную оценку относительного содержания различных гликоформ с использованием МС.

Краткая сущность изобретения

В одном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способ усиления масс-спектрального сигнала, включающий: приведение образца в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образца связываться с субстратом; применение первого градиента подвижной фазы к разделительной колонке, при этом первый градиент подвижной фазы включает трифторуксусную кислоту (ТФУ) и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту), муравьиную кислоту (МК) и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту) или формиат аммония и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту); применение второго градиента подвижной фазы к разделительной колонке, при этом второй градиент подвижной фазы включает трифторуксусную кислоту в ацетонитриле (АЦН) и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту), муравьиную кислоту (МК) в ацетонитриле (АЦН) и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту) или формиат аммония в воде и ацетонитриле (АЦН) и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту); и проведение масс-спектрометрического анализа элюированных компонентов образца.

В некоторых вариантах реализации, низкомолекулярная добавка в первой подвижной фазе представляет собой глицин.

В некоторых вариантах реализации, низкомолекулярная добавка в первой подвижной фазе представляет собой глицин, а концентрация составляет между около 1 мМ до около 2 мМ глицина.

В некоторых вариантах реализации, концентрация глицина в первой подвижной фазе составляет около 1 мМ.

В некоторых вариантах реализации, концентрация глицина в первой подвижной фазе составляет около 2 мМ.

В некоторых вариантах реализации, низкомолекулярная добавка во второй подвижной фазе представляет собой глицин.

В некоторых вариантах реализации, низкомолекулярная добавка во второй подвижной фазе представляет собой глицин, а концентрация составляет от около 1 до около 2 мМ глицина.

В некоторых вариантах реализации, концентрация глицина во второй подвижной фазе составляет около 1 мМ.

В некоторых вариантах реализации концентрация глицина во второй подвижной фазе составляет около 2 мМ.

В некоторых вариантах реализации, концентрация ТФУ в первой подвижной фазе составляет от около 0,05 до 0,1% ТФУ в H₂O или концентрация МК в первой подвижной фазе составляет около 0,1% МК.

В некоторых вариантах реализации изобретения, концентрация ТФУ во второй подвижной фазе составляет около 0,05% ТФУ в 80% АЦН и 20% H₂O или около 0,1% ТФУ в 80% АЦН и 20% H₂O.

В некоторых вариантах реализации изобретения, концентрация формиата аммония в первых подвижных фазах составляет 50 мМ, рН составляет 4,4.

В некоторых вариантах реализации, вторая подвижная фаза содержит 15% 50 мМ формиата аммония, рН 4,4 в H₂O и 85% АЦН.

В некоторых вариантах реализации изобретения, образец содержит пептиды, нуклеотиды или гликаны.

В некоторых вариантах реализации, пептиды представляют собой гликопептиды.

В некоторых вариантах реализации, гликопептиды получены из моноклонального антитела.

В некоторых вариантах реализации, моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

В некоторых вариантах реализации изобретения, способ дополнительно включает подготовку образца перед контактированием образца с разделительной колонкой в условиях, позволяющим компонентам образца связываться с субстратом.

В некоторых вариантах реализации изобретения, подготовка образца включает: приведение образца в контакт с денатурирующим и восстанавливающим раствором в условиях, которые допускают денатурацию и восстановление образца; приведение в контакт денатурированного и восстановленного образца с алкилирующим раствором в условиях, допускающих алкилирование образца; приведение в контакт алкилированного образца с раствором гидролизата в условиях, позволяющих гидролизовать образец; и приведение расщепленного образца в контакт с гасящим раствором в условиях, которые останавливают расщепление образца.

В некоторых вариантах реализации изобретения, подготовка образца включает: высвобождение гликанов из образцов с использованием ферментов или химической реакции; маркирование высвобожденных гликанов флуоресцентными метками или восстановление высвобожденных гликанов с помощью восстановительных агентов.

В некоторых вариантах реализации, образец представляет собой моноклональное антитело, а расщепленный раствор содержит протеазу.

В некоторых вариантах реализации, протеаза содержит трипсин.

В некоторых вариантах реализации, разделительная колонка представляет собой разделительную колонку для жидкостной хроматографии (ЖХ).

В некоторых вариантах реализации, разделительная колонка ЖХ включает жидкостную хроматографическую колонку гидрофильного взаимодействия (HILIC).

В некоторых вариантах реализации изобретения, масс-спектрометрический анализ элюированных компонентов пробы включает применение ионизации электрораспылением для образования заряженных ионов из элюированных компонентов пробы и измерение образовавшихся заряженных ионов.

В некоторых вариантах реализации, способ усиливает масс-спектральный сигнал, как указано, в среднем около 5-14 раз и/или приблизительно в около 2-1000 раз для частиц с высоким зарядом (например, $z \geq 3$).

В некоторых вариантах реализации, спектральный сигнал увеличивается приблизительно в 14 раз и/или около в 1000 раз для частиц с высоким зарядом.

В некоторых вариантах реализации, образец содержит гликопептид или гликан, и сигнал масс-спектра, полученный на элюированных компонентах образца, усиливается от 2 до 50 раз по сравнению с сигналом масс-спектра, полученным на контрольном образце в отсутствие низкомолекулярной добавки. В некоторых случаях гликопептид представляет собой гликопептид, содержащий O-гликан. В некоторых случаях гликопептид представляет собой гликопептид, содержащий N-гликан. В некоторых случаях гликан представляет собой O-гликан. В некоторых случаях гликан представляет собой N-гликан. В некоторых случаях O-гликан или N-гликан связан с меткой, необязательно прокаиномидом, 2-аминобензамидом или Rapifluor. В любом из этих вариантов реализации, низкомолекулярная добавка может представлять собой глицин.

В различных вариантах реализации изобретения, любые из признаков или компонентов вариантов реализации изобретения, обсуждаемых выше или описанных в данном документе, можно комбинировать, и такие комбинации входят в рамки настоящего изобретения. Любое конкретное значение, обсуждаемое выше или далее в данном документе, может быть комбинировано с другим взаимосвязанным значением, обсуждаемым выше или далее в данном документе, для определения диапазона, в котором указанные значения представляют собой верхний и нижний пределы диапазона, и такие диапазоны и все значения, входящие в такие диапазоны, охваченные в пределах объема настоящего изобретения. Каждое из значений, обсуждаемых выше или далее в настоящем документе, может быть указано с отклонением в 1, 5, 10 или 20%. Например, концентрация 10 мМ может быть указана как 10 мМ $\pm 0,1$ мМ (отклонение в 1%), 10 мМ $\pm 0,5$ мМ (отклонение в 5%), 10 мМ ± 1 мМ (отклонение в 10%) или 10 мМ ± 2 мМ (отклонение в 20%). Другие варианты реализации изобретения будут выявлены из обзора следующего подробного описания изобретения.

Описание графических материалов

На фиг. 1А и 1В показано влияние глицина в различных концентрациях на усиление МС и влияние различных количеств загрузки образца на усиление МС.

На фиг. 1С показана тяжелая цепь (SEQ ID NO: 1) и легкая цепь (SEQ ID NO: 2) NISTmAb.

На фиг. 2 представлена химическая структура производных глицина.

На фиг. 3 показано среднее кратное усиление MS1 триптических пептидов NISTmAb реагентом (2 мМ).

На фиг. 4 показано минимальное изменение хроматографического разделения пептидов после

добавления глицина к буферам ТФУ.

На фиг. 5 показана воспроизводимость усиления 2 мМ глицина в буферах ТФУ с загрузкой 0,25 мкг NISTmAb. Следующие пептиды показаны на фиг. 5: ALEWLADIWDDK (SEQ ID NO: 3), ALPAPIEK (SEQ ID NO: 4), DIQMTQSPSTLSASVGDR (SEQ ID NO: 34), DMIFNFYFDVWGQGTTVTVSSASTK (SEQ ID NO: 5), DSTYLSSTLTLSK (SEQ ID NO: 6), DTLMISR (SEQ ID NO: 7), EPQVYTLPPSR (SEQ ID NO: 8), ESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTAGMSVWIR (SEQ ID NO: 9), FNWYVDGVEVHNAK (SEQ ID NO: 10), FSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCFQSGSGYPFTFGGGTK (SEQ ID NO: 11), GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK (SEQ ID NO: 12), GPSVFPLAPSSK (SEQ ID NO: 13), HYNPSLK (SEQ ID NO: 14), LASGVPSR (SEQ ID NO: 15), LLIYDTSK (SEQ ID NO: 16), NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 17), NQVVLK (SEQ ID NO: 18), QVTLR (SEQ ID NO: 19) SGTASVVCLLNNFYPR (SEQ ID NO: 20), SLSLSPG (SEQ ID NO: 21), STSGGTAALGCLVK (SEQ ID NO: 22), THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO: 23), TPEVTCVVVDVSHEDPEVK (SEQ ID NO: 24), TTPPVLDSDGSFFLYSK (SEQ ID NO: 25), TVAAPSFIFFPSDEQLK (SEQ ID NO: 26), VDNALQSGNSQESVTEQDSK (SEQ ID NO: 27), VGYMHWYQQKPGK (SEQ ID NO: 28), VTITCSASSR (SEQ ID NO: 29), VTNMDPADTATYYCAR (SEQ ID NO: 30), VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO: 31), VYACEVTHQGLSSPVTK (SEQ ID NO: 32), и WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 33).

На фиг. 6 показано отношение сигнал/шум, наблюдаемое с контролем ТФУ и ТФУ в присутствии глицина, при загрузке 2,5 мкг гидролизата NISTmAb.

Фиг. 7, 8А и 8В показывают изменение состояния заряда в присутствии глицина. Следующие пептиды показаны на фиг. 7: ALEWLADIWDDK (SEQ ID NO: 3), ALPAPIEK (SEQ ID NO: 4), DIQMTQSPSTLSASVGDR (SEQ ID NO: 34), DMIFNFYFDVWGQGTTVTVSSASTK (SEQ ID NO: 5), DSTYLSSTLTLSK (SEQ ID NO: 6), DTLMISR (SEQ ID NO: 7), EPQVYTLPPSR (SEQ ID NO: 8), ESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTAGMSVWIR (SEQ ID NO: 9), FNWYVDGVEVHNAK (SEQ ID NO: 10), FSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCFQSGSGYPFTFGGGTK (SEQ ID NO: 11), GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK (SEQ ID NO: 12), GPSVFPLAPSSK (SEQ ID NO: 13), HYNPSLK (SEQ ID NO: 14), LASGVPSR (SEQ ID NO: 15), LLIYDTSK (SEQ ID NO: 16), NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 17), NQVVLK (SEQ ID NO: 18), QVTLR (SEQ ID NO: 19) SGTASVVCLLNNFYPR (SEQ ID NO: 20), SLSLSPG (SEQ ID NO: 21), STSGGTAALGCLVK (SEQ ID NO: 22), THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO: 23), TPEVTCVVVDVSHEDPEVK (SEQ ID NO: 24), TTPPVLDSDGSFFLYSK (SEQ ID NO: 25), TVAAPSFIFFPSDEQLK (SEQ ID NO: 26), VDNALQSGNSQESVTEQDSK (SEQ ID NO: 27), VGYMHWYQQKPGK (SEQ ID NO: 28), VTITCSASSR (SEQ ID NO: 29), VTNMDPADTATYYCAR (SEQ ID NO: 30), VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO: 31), VYACEVTHQGLSSPVTK (SEQ ID NO: 32), and WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 33). Исследования, выполненные с использованием пептида с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 9 показаны на фиг. 8А, а пептид с остатками SEQ ID NO: 18 на фиг. 8В.

На фиг. 9 показано количественное определение РТМ% в присутствии и в отсутствие 2 мМ глицина (буферы ТФУ, загрузка 0,25 мкг NISTmAb).

На фиг. 10 показано кратное усиление за счет присутствия глицина с ТФУ, или МК, или только МК по сравнению с контролем ТФУ. Пептиды со следующими остатками показаны на фиг. 10: ALEWLADIWDDK (SEQ ID NO: 3), ALPAPIEK (SEQ ID NO: 4), DIQMTQSPSTLSASVGDR (SEQ ID NO: 34), DMIFNFYFDVWGQGTTVTVSSASTK (SEQ ID NO: 5), DSTYLSSTLTLSK (SEQ ID NO: 6), DTLMISR (SEQ ID NO: 7), EPQVYTLPPSR (SEQ ID NO: 8), ESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTAGMSVWIR (SEQ ID NO: 9), FNWYVDGVEVHNAK (SEQ ID NO: 10), FSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYYCFQSGSGYPFTFGGGTK (SEQ ID NO: 11), GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK (SEQ ID NO: 12), GPSVFPLAPSSK (SEQ ID NO: 13), HYNPSLK (SEQ ID NO: 14), LASGVPSR (SEQ ID NO: 15), LLIYDTSK (SEQ ID NO: 16), NQVSLTCLVK (SEQ ID NO: 17), NQVVLK (SEQ ID NO: 18), QVTLR (SEQ ID NO: 19) SGTASVVCLLNNFYPR (SEQ ID NO: 20), SLSLSPG (SEQ ID NO: 21), STSGGTAALGCLVK (SEQ ID NO: 22), THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO: 23), TPEVTCVVVDVSHEDPEVK (SEQ ID NO: 24), TTPPVLDSDGSFFLYSK (SEQ ID NO: 25), TVAAPSFIFFPSDEQLK (SEQ ID NO: 26), VDNALQSGNSQESVTEQDSK (SEQ ID NO: 27), VGYMHWYQQKPGK (SEQ ID NO: 28), VTITCSASSR (SEQ ID NO: 29), VTNMDPADTATYYCAR (SEQ ID NO: 30), VVSVLTVLHQDWLNGK (SEQ ID NO: 31), VYACEVTHQGLSSPVTK (SEQ ID NO: 32), and WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK (SEQ ID NO: 33).

На фиг. 11 показано кратное усиление отдельных аминокислот с помощью 2 мМ глицина.

На фиг. 12 показано влияние следовых количеств натрия в коммерческих препаратах глицина на пептид TTPPVLDSDGSFFLYSK (SEQ ID NO: 25).

На фиг. 13 представлено сравнение количественного определения пептида STSGGTAALGCLVK (SEQ ID NO: 22) с использованием PRM и полного сканирования.

Фиг. 14 иллюстрирует некоторые преимущества жидкостной хроматографии на основе HILIC по сравнению с обращенной фазой для гликопептидного анализа пептида с 9 остатками.

На фиг. 15 показано усиление сигнала, наблюдаемое в буфере с добавлением глицина как для MS1, так и для MS2.

На фиг. 16 показано, что 2 мМ глицина предотвращает связывание.

На фиг. 17 представлена примерная схема рабочего процесса подготовки проб для анализа гликопептидов с помощью ЖХ на основе IP-HILIC.

На фиг. 18 показан эффект обессоливания, при котором обессоливание с помощью картриджа SepPak 30 устранило повышенную базовую линию (см. стрелку).

На фиг. 19 и 20 представлены таблицы, иллюстрирующие влияние глицина на пиковую зону.

На фиг. 21А и 21В показана пиковая зона всех гликоформ в оцененных mAb.

На фиг. 22 показана повышенная способность к фрагментации за счет сдвига состояния заряда в присутствии 1 мМ глицина пептида с 9 остатками.

На фиг. 23 показано, что глицин увеличивает количество совпадений пептидного спектра (PSM) и гликоформ в VEGF TRAP.

На фиг. 24 показано количество вариантов последовательностей, идентифицированных при использовании ТФУ+глицин, по сравнению с МК после биологической проверки.

На фиг. 25 показано усиление действия глицина на N-гликаны сыворотки, маркированные PROCA, в подвижных фазах формиата аммония. Показана масс-спектрометрия (МС), экстрагированная ионная хроматография (EIC) и флуоресцентная (FLR) хроматограмма, следы маркированных PROCA N-гликанов из сыворотки человека, проанализированных с помощью HILIC с использованием формиата аммония, содержащего подвижные фазы (контроль) и те же подвижные фазы с дополнительным 1 мМ глицин (Глицин).

Фиг. 26А, 26В и 26С иллюстрируют суммарные сигналы МС PROCA-маркированных N-гликанов в подвижных фазах формиата аммония. На фиг. 26А и 26В показана кратность усиления сигнала МС для N-гликанов сыворотки, маркированных PROCA, за счет включения 1 мМ глицина в подвижные фазы формиата аммония. На фиг. 26В показаны пиковые зоны МС ЭИХ для N-гликанов сыворотки, маркированных PROCA, в подвижных фазах, содержащих формиат аммония (контроль), и тех же подвижных фазах с дополнительным 1 мМ глицина (Глицин).

Фиг. 27 иллюстрирует, что масс-хроматограммы с глицинсодержащими подвижными фазами имеют большее сходство с хроматограммой ФЛР, чем с контрольными подвижными фазами. Показаны наложенные масс ЭИХ и ФЛР хроматограммы N-гликанов, маркированных PROCA, из сыворотки человека, проанализированные с помощью HILIC с использованием подвижных фаз, содержащих формиат аммония (контроль), и тех же подвижных фаз с дополнительным 1 мМ глицина (Глицин).

На фиг. 28А, 28В и 28С иллюстрировано сравнение интенсивностей пиков МС N-гликанов сыворотки, маркированных PROCA, с глицином и без него в подвижных фазах формиата аммония. Показаны относительные уровни PROCA-маркированных N-гликанов на основе пиковых зон ФЛР или МС ЭИХ, нормализованные к уровням FA2G2, проанализированным с помощью HILIC с использованием подвижных фаз, содержащих формиат аммония (контроль), и тех же подвижных фаз с добавлением 1 мМ глицина (Глицин).

Фиг. 29 иллюстрирует, что площади пиков МС гликанов, маркированных PROCA, более пропорциональны пиковым зонам FLR в подвижных фазах формиата аммония с глицином. Показана диаграмма рассеяния пиковых зон N-гликанов EIC в сыворотке по сравнению с площадями пиков FLR (логарифмическая шкала) для анализа с использованием подвижных фаз формиата аммония без (контроль) и с (Глицин) добавкой 1 мМ глицина. Показаны уравнения и значения R-квадрата линейной регрессии для каждого условия. Меньшее значение R квадрата для условий с глицином по сравнению со значением для контрольных условий демонстрирует, что N-гликаны, маркированные PROCA, могут быть более точно количественно определены с помощью МС с добавлением глицина к подвижным фазам.

Фиг. 30А, 30В и 30С иллюстрируют усиление сигнала МС маркированных PROCA N-гликанов глицином в подвижных фазах муравьиной кислоты. На фиг. 30А и фиг. 30С показана кратность усиления сигнала МС для N-гликанов сыворотки, маркированных PROCA, при добавлении 1 мМ глицина в подвижные фазы с 0,1% МК, проанализированные с помощью HILIC. На фиг. 30В показаны зоны пиков MS EIC для N-гликанов сыворотки, маркированных PROCA, в подвижных фазах с 0,1% FA (контроль) и таких же подвижных фазах с дополнительным 1 мМ глицином (Глицин).

Фиг. 31А, 31В и 31С иллюстрируют сравнение интенсивностей пиков МС N-гликанов плазмы, маркированных Rapifluor, с глицином и без него в подвижных фазах формиата аммония. Показаны относительные уровни N-гликанов, маркированных Rapifluor, на основе пиковых зон FLR или MS EIC, нормализованные к уровням FA2G2, проанализированным с помощью HILIC с использованием подвижных фаз, содержащих формиат аммония (контроль), и тех же подвижных фаз с дополнительным 1 мМ глицина (Глицин). На фиг. 31А также показаны кратности усиления сигнала МС и сдвига состояния заряда для N-гликанов сыворотки, маркированных PROCA, за счет добавки глицина.

Фиг. 32 иллюстрирует сравнение интенсивностей пиков уменьшенного N-гликана в сыворотке с глицином и без него в подвижных фазах формиата аммония. Представлена таблица, показывающая изменение сигнала МС и средние состояния заряда восстановленных N-гликанов сыворотки, проанализированные с помощью HILIC с использованием формиата аммония, содержащего подвижные

фазы (контроль) и те же самые подвижные фазы с дополнительным 1 мМ глицина (Глицин).

Фиг. 33 иллюстрирует условия LC-FLR-MS для анализа маркированных или восстановленных N-гликанов.

На фиг. 34 показан типичный способ получения и анализа O-гликанов с помощью LC-MS и обнаружения FLR.

На фиг. 35 показаны O-гликаны, маркированные PROCA, из бычьего подчелюстного муцина (BSM) 2 мкг на колонке, флуоресценция и оптимизированное восстановительное аминирование.

На фиг. 36 показано, что профили TIC FL и MS TIC для O-гликанов, маркированных PROCA, в высокой степени сопоставимы.

На фиг. 37A и 37B показано сравнение интенсивностей пиков MS O-гликана подчелюстного муцина (BSM) крупного рогатого скота с глицином и без него в подвижных фазах формиата аммония. На фиг. 37A показаны хроматограммы MS EIC и FLR маркированных PROCA O-гликанов из BSM, проанализированных с помощью HILIC с использованием подвижных фаз, содержащих формиат аммония (контроль), и тех же подвижных фаз с дополнительным 1 мМ глицина (Глицин). На фиг. 37B показано сравнение интенсивностей пиков FLR и MS для O-гликанов (нормализованных до значений HexNAc1NeuAc1) с глицином и без него в подвижных фазах.

Фиг. 38A, 38B и 38C иллюстрируют эффекты усиления глицина на O-гликаны BSM без или с различными метками. На фиг. 38A показано усиление действия глицина на O-гликаны BSM, маркированные PROCA. На фиг. 38B показано усиление действия глицина на O-гликаны BSM, маркированные 2AB.

На фиг. 38C показано усиление действия глицина на восстановленные O-гликаны BSM.

На фиг. 39 показаны примерные условия LC-FLR-MS для анализа меченых или восстановленных O-гликанов.

Фиг. 40 и 41 иллюстрируют влияние глицина на подтверждение MS2 структуры O-гликана, которая имеет очень низкий уровень при использовании очистки гранул.

На фиг. 42A показаны профили TIC типичного IgG4 в оптимизированных условиях IP-HILIC в присутствии добавки глицина и без глицина.

На фиг. 42B показаны следы УФ-хроматограммы триптического гидролизата mAb1 для анализа IP-HILIC-MS с использованием подвижной фазы, содержащей 1 мМ глицина, и контрольных условий.

На фиг. 42C-1, 42C-2 и 42C-3 показано сравнение разделения изоформ (слева) и нескольких гликоформ (справа) с использованием различных длин линейного градиента для IP-HILIC-MS.

На фиг. 42D и 42E показаны примеры tandemных масс-спектров гликопептидов из IgG4. Показаны спектры с наивысшим баллом среди всех PSM для гликопептидов.

Фиг. 42F показывает пики EIC гликопептидов для mAb2, проанализированные с использованием IP-HILIC-MS. Коробки представляют структуры гликанов с использованием согласованной номенклатуры символов для гликанов (SNFG): квадрат, N-ацетилглюкозамин; треугольник, фукоза; круг, манноза; круг, галактоза; алмаз, N-ацетилнейраминавая кислота.

На фиг. 42G показаны пики EIC высвобожденных гликанов из mAb2, проанализированных с использованием HILIC-FLR-MS при pH 5,5.

На фиг. 42H-1 и 42H-2 показана RPLC-MS триптических пептидов из IgG4 с использованием 80-минутного градиента. Все гликоформы элюируются в виде одного кластера (правая панель); и эффективное разделение гликоформ в IP-HILIC-MS исключает искусственные гликоформы, полученные в результате фрагментации в источнике (левая панель).

На фиг. 43A и 43B показаны все гликоформы mAb1 в сайте гликозилирования Fc N297, определенные количественно на основе анализов IP-HILIC-MS с глицином и без него, показаны как абсолютные зоны пиков EIC на фиг. 35A и относительное содержание каждого отдельного гликана на фиг. 35B.

На фиг. 43C представлена таблица измеренной пиковой зоны EIC и относительного количественного определения индивидуальных гликоформ mAb1 (IgG4).

На фиг. 43D-1, 43D-2 и 43D-3 показан анализ гликопептидов на mAb5 (IgG1) - хроматограмма TIC; профиль элюирования наиболее распространенных 10 гликоформ проанализирован с использованием IP-HILIC-MS; профиль элюирования наиболее распространенных 10 гликоформ проанализирован с использованием RPLC-MS; усиление сигнала ESI с помощью глицина для каждой отдельной гликоформы; и относительный процент каждой идентифицированной гликоформы.

На фиг. 43E представлена таблица измеренной площади пика EIC и относительного количественного определения индивидуальных гликоформ из mAb5 (IgG1). * Изменение кратности резко увеличивается, когда площади пиков гликоформ в контрольном образце низки из-за плохого обнаружения.

На фиг. 43F и 43G показаны примеры tandemных масс-спектров триптических пептидов из fP1, проанализированных с помощью IP-HILIC-MS с использованием подвижных фаз, содержащих 0,1% ТФУ (фиг. 35G) или 0,1% ТФУ+1 мМ глицина в качестве усилителя сигнала (фиг. 35F). Оба спектра имеют самый высокий балл среди всех PSM для этого гликопептида.

На фиг. 44А и 44В показано сравнение идентификации гликопептида слитого белка fP1 с Fc-доменом среди различных способов разделения. IP-HILIC с ТФУ, HILIC с МК и RPLC с ТФУ. 1 мМ глицина применяли для всех экспериментов, чтобы исключить влияние подавления ионов во время обнаружения MS. На фиг. 36А показаны полные карты сайт-специфического гликозилирования. На фиг. 36В показано суммарное количество идентифицированных гликопептидов различными способами.

На фиг. 44С показано изменение кратности сигнала на основе глицина для различных пептидов, содержащих гликозит.

На фиг. 44D показано профили экстракции ионов оксония (желтая дорожка) и TIC (другие дорожки) расщепленного fP1, проанализированные с помощью IP-HILIC-MS с ТФУ (верхняя панель), HILIC-MS с FA (средняя панель) и RPLC-MS с ТФУ (нижняя панель).

На фиг. 45А показаны пики EIC четырех репрезентативных гликоформ в 7 гликозитосодержащих пептидах из fP1. Цвет пептидной последовательности указывает на аминокислоты, потенциально способствующие гидрофильности, показанные как полярные остатки, содержащие гидроксильную, амидную или первичную аминогруппу (оранжевый), и сильные полярные остатки, содержащие гуанидиногруппу (красный), и гликозилированный аспарагин (синий).

На фиг. 45В и 45С показаны тандемные масс-спектры гликопептида в неканоническом сайте N-гликозилирования и незанятого пептида, идентифицированного в mAb3.

На фиг. 45D показан относительный процент N-гликозилирования с низким содержанием в неканоническом сайте mAb3, проанализированный с использованием IP-HILIC-MS.

На фиг. 45Е и 45F показаны тандемные масс-спектры O-связанного гликопептида и незанятого пептида, идентифицированного в mAb4.

На фиг. 46А, 46В, 46С и 46D показана EIC для неканонических N-гликозилированных пептидов с низким содержанием и хроматограмма основного пика (BPC) для mAb3, полученная с помощью (A)(C) RPLC-MS с глицином и (B)(D) IP-HILIC-MS с вводом пробы 4,5 мкг. Интенсивность пика MS была нормализована с использованием самого высокого пика. Номера пиков 1-4 представляют Man5, Man6, Man7 на N91 и FA2G2 на N163 соответственно.

На фиг. 46Е показана экстракция MS1 идентифицированного O-связанного гликопептида в mAb4.

Подробное описание сущности изобретения

Перед описанием сущности настоящего изобретения следует понимать, что данное изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для описания частных вариантов осуществления и не подразумевает ограничительного характера, так как объем настоящего изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты реализации, или признаки вариантов реализации, могут быть объединены друг с другом, и такие комбинации входят в объем настоящего изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. В настоящем документе термин "около" при использовании в отношении конкретного приведенного числового значения означает, что значение может отличаться от приведенного значения не более чем на 1%. Например, в настоящем документе выражение "около 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, могут использоваться при практическом осуществлении или испытании данного изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны далее. Содержание всех патентов, заявок и непатентных публикаций, упомянутых в настоящей спецификации, включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Сокращения, используемые в дальнейшем.

ACN: ацетонитрил.

ESI-MS: масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением.

FA: муравьиная кислота.

FLR: флуоресцентное обнаружение.

HC: тяжелая цепь.

HESI: ионизация электрораспылением с подогревом.

HILIC: жидкостная хроматография гидрофильного взаимодействия.

IP-HILIC: ионно-парная хроматография гидрофильного взаимодействия.

IgG: иммуноглобулин G.

LC: легкая цепь.

ЖХ-МС: жидкостная хроматография-масс-спектрометрия.

mAb: моноклональное антитело.

MPA: мобильная фаза AACN.

MPB: мобильная фаза B.

MS: масс-спектрометрия.

MW: молекулярный вес.

PROCA: прокаинамид.

2-AB: 2-аминобензамид.

PTM: пост-трансляционные модификации.

RPLC: жидкостная хроматография с обращенной фазой.

RPLC-MS/MS: жидкостная хроматография с обращенной фазой, tandemная масс-спектрометрия.

SPE: твердофазная экстракция.

ТФУ: трифторуксусная кислота.

UV: ультрафиолет.

Определения.

Термин "антитело", используемый в данном документе, предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями (т.е., "молекулами полноразмерного антитела"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из сменной области тяжелой цепи (HCVR или V_H) и постоянной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1} , C_{H2} и C_{H3}). В различных вариантах реализации изобретения, тяжелая цепь может быть изотипом IgG. В некоторых случаях тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации, тяжелая цепь относится к изотипу IgG1 или IgG4, необязательно включая химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из сменной области легкой цепи ("LCVR" или " V_L ") и постоянной области легкой цепи (C_L). В V_H и V_L областях можно дополнительно выделить области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), которые разделены более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Для обзора структуры антител см. Lefranc et al., уникальная нумерация IMGT для переменных доменов иммуноглобулина и T-клеточного рецептора и V-подобных доменов суперсемейства Ig, 27(1) Dev. Comp. Immunol. 55-77 (2003 г.); и М. Поттер, Структурные корреляты разнообразия иммуноглобулинов, 2(1) Выж. Immunol. Res. 27-42 (1983).

Термин "антитело" также включает "биспецифическое антитело", которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться более чем с одним различным эпитопом. Одна половина биспецифического антитела, которое включает одну тяжелую цепь и одну легкую цепь и шесть CDR, связывается с одним антигеном или эпитопом, а другая половина антитела связывается с другим антигеном или эпитопом. В некоторых случаях биспецифическое антитело может связывать один и тот же антиген, но с разными эпитопами или с неперекрывающимися эпитопами. В некоторых случаях обе половины биспецифического антитела имеют идентичные легкие цепи, сохраняя при этом двойную специфичность. Биспецифические антитела в целом описаны в U.S. Patent App. Пуб. № 2010/0331527 (30 декабря 2010 г.).

Термины "антигенсвязывающий фрагмент" антитела (или "фрагмент антитела"), относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостом в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) Nature 241: 544-546), который состоит из домена VH, (vi) выделенный CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием единой белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются, образуя одновалентные молекулы. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охватываются термином "антитело" (см., например, Holliger et al. (1993) 90 PNAS USA 6444-6448; и Poljak et al. (1994) 2 структура 1121-1123).

Кроме того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием стандартных способов рекомбинантных ДНК, широко известных в данной области (см. Sambrook et al., 1989). Способы получения антител человека у трансгенных мышей известны в данной области техники. С использованием технологии VELOCIMMUNE™ (см., например, патент США № 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любой другой известный способ получения моноклональных антител, сначала выделяют химерные антитела с высоким сродством к желаемому антигену, имеющие сменную область человека и постоянную область мышей. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, геном которой содержит сменные области тяжелой и легкой цепи человека,

функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что мышь продуцирует антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши, в ответ на антигенную стимуляцию. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепи человека. Затем ДНК экспрессируют в клетке, способной экспрессировать полностью человеческое антитело.

Предусмотрено, что термин "антитело человека" включает антитела, имеющие переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие моноклональные антитела (mAb) по данному изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. В то же время термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, не предполагает включение mAb, в которых последовательности CDR, происходящие из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мыши), были привиты к FR последовательностям человека. Указанный термин включает антитела, рекомбинантно продуцируемые в организме млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Указанный термин не предназначен для включения антител, выделенных из или полученных в организме субъекта-человека.

Используемый в данном документе термин "гликопептид/гликопротеин" представляет собой модифицированный пептид/белок во время или после их синтеза с ковалентно связанными углеводами или гликаном. В некоторых вариантах реализации изобретения, гликопептид получают из моноклонального антитела, например, из протеазного гидролизата моноклонального антитела.

Используемый в данном документе термин "гликан" представляет собой соединение, содержащее одну или несколько единиц сахара, которые обычно включают глюкозу (Glc), галактозу (Gal), маннозу (Man), фукозу (Fuc), N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилнейраминовую кислоту (NeuNAc) (Frank Kjeldsen, et al. Anal. Chem. 2003, 75, 2355-2361). Фрагмент гликана в гликопротеине, таком как моноклональное антитело, является важным признаком для определения его функции или расположения в клетке. Например, конкретное моноклональное антитело модифицировано специфическим фрагментом гликана.

Термин "хроматография гидрофильного взаимодействия" или HILIC предназначен для включения процесса, использующего гидрофильную стационарную фазу и гидрофобную органическую подвижную фазу, в которых гидрофильные соединения сохраняются дольше, чем гидрофобные соединения. В некоторых вариантах реализации, в процессе используется смешиваемая с водой подвижная фаза растворителя.

Используемый здесь термин "образец" относится к смеси молекул, которая содержит, по крайней мере, молекулу анализируемого вещества, например, гликопептид, полученный из моноклонального антитела, который подвергается манипуляции в соответствии со способами изобретения, включая, например, разделение, анализ, извлечение, концентрирование или профилирование.

Термины "анализ" или "анализирование", используемые в данном документе, используются взаимозаменяемо и относятся к любому из различных способов разделения, обнаружения, выделения, очистки, солиubilизации, обнаружения и/или характеристики представляющих интерес молекул (например, гликопротеина). Примеры включают, но не ограничиваются ими, твердофазную экстракцию, твердофазную микроэкстракцию, электрофорез, масс-спектрометрию, например, ESI-MS, SPE HILIC или MALDI-MS, жидкостную хроматографию, например, высокоэффективную, например, обращенную фазу, нормальную фазу или вытеснение по размеру, ионно-парную жидкостную хроматографию, жидкостно-жидкостную экстракцию, например, ускоренная жидкостная экстракция, сверхкритическая жидкостная экстракция, микроволновая экстракция, мембранная экстракция, экстракция по Сокслету, осаждение, осветление, электрохимическое обнаружение, окрашивание, элементный анализ, деградация по Эдмунду, ядерно-магнитный резонанс, инфракрасный анализ, проточный анализ, капиллярная электрохроматография, ультрафиолетовое обнаружение и их комбинации.

Термин "профилирование", используемый в данном документе, относится к любому из различных способов анализа, которые используются в комбинации для определения содержания, состава или характеристического соотношения гликопептидов в образце.

"Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением" или "ESI-MS" - это способ, используемый в масс-спектрометрии для получения ионов с помощью электрораспыления, при котором к жидкости подается высокое напряжение для создания аэрозоля. Например, при электрораспылении ионы создаются из белков в растворе, что позволяет ионизировать неповрежденные хрупкие молекулы, что может сохранить нековалентные взаимодействия. Ионизация электрораспылением является предпочтительным источником ионов для сочетания жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ЖХ-МС). Анализ можно проводить онлайн, подавая жидкость, элюирующуюся из ЖХ-колонок, непосредственно в электрораспылитель, или в автономном режиме, собирая фракции для последующего анализа в классической установке масс-спектрометрии с наноэлектрораспылением. ЖХ-МС можно

использовать для характеристики белков, включая количественную оценку биомаркеров, анализ вариантов последовательностей, а также идентификацию и количественную оценку гликопептидов.

"Приведение в контакт", как использовано в данном документе, включает соединение по меньшей мере двух веществ в растворе или твердой фазе.

Общее описание.

Таким образом, существует потребность в способах характеристики белков с повышенной чувствительностью. Описанное изобретение отвечает этой потребности.

В данном документе описан новый способ характеристики белков на основе ЖХ-МС, который повышает чувствительность определения масс-спектров. Этот новый способ основан на исследованиях, описанных в настоящем документе, в которых авторы изобретения сделали неожиданное открытие, что включение низкомолекулярной добавки (например, аминокислоты или модифицированной аминокислоты) в растворы подвижной фазы во время жидкостной хроматографии приводит к значительному увеличению масс-спектрального сигнала по сравнению с сигналом, генерируемым в отсутствие таких низкомолекулярных добавок. Авторы изобретения также обнаружили, что присутствие такой добавки, например аминокислоты (например, глицина), не влияет на удерживание и хроматографическое разделение пептидов и гликанов на ЖХ-колонке при добавлении в буферы для подвижной фазы. Кроме того, эффекты добавок, например, аминокислоты, такой как глицин, на усиление сигнала, изменение состояния заряда и количественное определение пептидов и гликанов с помощью ПТМ, были воспроизводимыми. Дополнительно, ТФУ и буфер глицина улучшает нижний предел количественного определения (LLOQ) при количественном определении белка, более уверенно идентифицирует гликопептиды, не влияя на относительное количественное определение по сравнению с обычным буфером ТФУ в способе IP-HILIC-LC-MS, и идентифицирует больше вариантов последовательности при создании дополнительной информации по сравнению с буфером FA, регулярно используемым для анализа вариантов последовательности. Таким образом, описанное открытие имеет очень широкий спектр применений для характеристики белков на основе ЖХ-МС за счет повышения чувствительности масс-спектрометрии. В некоторых вариантах реализации изобретения, описанные способы можно использовать для количественного определения биомаркеров, анализа вариантов последовательностей и/или идентификации и количественного определения пептидов, таких как гликопептиды, и/или гликанов с помощью ЖХ-МС.

В некоторых вариантах реализации изобретения, способ включает приведение образца в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образца связываться с субстратом; нанесение подвижного градиента на разделительную колонку, при этом буфер подвижного градиента содержит низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту) и ТФУ, FA, формиат аммония или и/или ACN; и проведение масс-спектрометрического анализа элюированных компонентов образца.

Используемая подвижная фаза может включать буферы с агентами связывания ионов и без них, например, ацетонитрил и воду. Агенты связывания ионов включают формиат, ацетат, трифторуксусную кислоту и соли. Можно использовать градиенты буферов, например, если используются два буфера, концентрация или процентное содержание первого буфера может уменьшаться, в то время как концентрация или процентное содержание второго буфера увеличивается в ходе цикла хроматографии. Например, процентное содержание первого буфера может уменьшаться от около 100, около 99, около 95, около 90, около 85, около 80, около 75, около 70, около 65, около 60, около 50, около 45 или около 40 до около 0, около 1, около 5, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35 или около 40% в течение цикла хроматографии. В качестве другого примера, процентное содержание второго буфера может увеличиваться от около 0, около 1, около 5, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 35 или от около 40 до около 100, около 99, около 95, около 90, около 85, около 80, около 75, около 70, около 65, около 60, около 50, около 45, или около 40% в течение того же цикла. Опционально, концентрация или процентное содержание первого и второго буферов могут возвращаться к своим начальным значениям в конце цикла хроматографии. Например, процентное содержание первого буфера может изменяться в пять этапов с 85 до 63, до 59, до 10 и до 85%; в то время как процентное содержание второго буфера на тех же этапах изменяется с 15 до 37, до 41, до 90, до 15%. Проценты могут изменяться постепенно в виде линейного градиента или нелинейного (например, ступенчатого) образа. Например, градиент может быть многофазным, например, двухфазным, трехфазным и т.д. В некоторых вариантах реализации изобретения, в способах, описанных в настоящем документе, используется уменьшающийся градиент ацетонитрильного буфера, который соответствует возрастающей полярности подвижной фазы без использования ионных связывающих агентов.

В некоторых вариантах реализации, нанесение подвижного градиента на разделительную колонку включает нанесение первого буфера подвижного градиента на разделительную колонку, при этом первый буфер подвижной фазы включает ТФУ и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту), FA и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту) или формиат аммония и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту) и применение второго подвижного градиента к разделительной колонке, в которой второй буфер подвижной фазы содержит ТФУ в ACN и низкомолекулярную добавку (например, аминокислоту), FA в ACN и низкомолекулярную добавку

(например, аминокислоту) или или формиат аммония в воде/ACN и низкомолекулярную добавку.

В различных вариантах реализации, низкомолекулярная добавка выбрана из глицина, аланина, серина, валина, N-ацетилглицина, метионина, β -аланина, аспарагиновой кислоты или N-метилглицина. В некоторых случаях, аминокислота выбрана из глицина, аланина, серина или валина. В некоторых вариантах реализации изобретения, аминокислота представляет собой аланин. В некоторых вариантах реализации изобретения, аминокислота представляет собой серин. В некоторых вариантах реализации изобретения, аминокислота представляет собой валин. В некоторых вариантах реализации, аминокислота в первом буфере подвижной фазы представляет собой глицин. В некоторых вариантах реализации, аминокислота во втором буфере подвижной фазы представляет собой глицин. В некоторых вариантах реализации, аминокислота в первом и втором буферах подвижной фазы представляет собой глицин. В некоторых вариантах реализации, низкомолекулярная добавка (например, аминокислота) в первом и/или втором буфере подвижной фазы представляет собой одно из низкомолекулярных соединений (например, модифицированные аминокислоты) или другие аминокислоты, указанные выше или в данном документе.

Концентрация низкомолекулярной добавки (например, аминокислоты) в буфере подвижной фазы составляет от около 0,5 до около 5 мМ, от около 0,5 до около 3 мМ, от около 1 до около 2 мМ, включая 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, низкомолекулярная добавка (например, аминокислота) составляет менее 5 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, низкомолекулярная добавка представляет собой глицин в концентрации менее 5 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, аминокислота в первом буфере подвижной фазы представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет от около 1 до около 2 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, аминокислота во втором буфере для подвижной фазы представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет от около 1 до около 2 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, концентрация глицина в первом буфере подвижной фазы составляет около 1 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, концентрация глицина в первом буфере подвижной фазы составляет около 2 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, аминокислота во втором буфере для подвижной фазы представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет от около 1 до около 2 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, концентрация глицина во втором буфере подвижной фазы составляет около 1 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, концентрация глицина во втором буфере подвижной фазы составляет около 2 мМ. В некоторых вариантах реализации изобретения, аминокислота в первом и втором буфере подвижной фазы представляет собой глицин, и концентрация глицина составляет от около 1 до около 2 мМ.

В некоторых вариантах реализации изобретения, концентрация ТФУ в первой подвижной фазе составляет от около 0,03 до 0,15% ТФУ в H_2O , например, от около 0,03 до 0,1%, или концентрация ГА составляет от около 0,05 до около 0,15% в H_2O , например около 0,1% ГА. В некоторых вариантах реализации изобретения, концентрация ТФУ составляет от около 0,05 до около 0,1% ТФУ в H_2O , или концентрация ГА в первой подвижной фазе составляет около 0,1% ГА. Например, концентрация ТФУ составляет около 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 или 0,1% в H_2O . В некоторых вариантах реализации изобретения, концентрация ТФУ во второй подвижной фазе составляет около 0,05% ТФУ в 80% ACN и 20% H_2O или около 0,1% ТФУ в 80% ACN и 20% H_2O . В некоторых вариантах реализации, концентрация ACN во второй подвижной фазе составляет от около 60 до 100%, например, от 80 до 100%, включая 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%.

В некоторых вариантах реализации, концентрация формиата аммония в первых подвижных фазах составляет 50 мМ в H_2O . В некоторых вариантах реализации, вторая подвижная фаза представляет собой 15% 50 мМ H_2O и 85% ACN.

В некоторых вариантах реализации, образец содержит пептиды, нуклеотиды или гликаны. Например, образец может включать гликопептиды, такие как гликопептиды, полученные из моноклонального антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения, моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

В некоторых вариантах реализации изобретения, способ включает подготовку образца перед введением его в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образца связываться с субстратом. В некоторых вариантах реализации изобретения, подготовка образца включает приведение образца в контакт с денатурирующим и восстанавливающим раствором в условиях, которые допускают денатурацию и восстановление образца; приведение в контакт денатурированного и восстановленного образца с алкилирующим раствором в условиях, допускающих алкилирование образца; приведение в контакт алкилированного образца с раствором гидролизата в условиях, позволяющих гидролизовать образец; и приведение переваренного образца в контакт с гасящим раствором в условиях, которые останавливают расщепление образца.

В некоторых вариантах реализации изобретения, подготовка образца включает: высвобождение гликанов из образцов с использованием ферментов или химической реакции; маркирование высвобожденных гликанов флуоресцентными метками или восстановление высвобожденных гликанов с

помощью восстановительных агентов.

В некоторых вариантах реализации изобретения, N-гликаны могут высвобождаться из гликопротеинов с использованием PNGase F. В некоторых вариантах реализации, O-гликаны могут высвобождаться из гликопротеинов с помощью основных химических веществ. Высвобожденные N-гликаны могут реагировать с флуоресцентной меткой RapIFluor. Высвобожденные N-гликаны и O-гликаны могут быть восстановлены боргидридом натрия или могут быть связаны с PROCA или 2-AB путем инкубации с уксусной кислотой и цианоборгидридом натрия.

В некоторых вариантах реализации изобретения, образец представляет собой моноклональное антитело, а расщепленный раствор содержит одну или несколько протеаз, таких как трипсин. В некоторых примерах используется способ для характеристики/анализа гликопептидов, таких как гликопептиды, полученные из моноклонального антитела, такого как антитело, расщепленное одной или несколькими протеазами. В некоторых вариантах реализации изобретения, антитело в образце может быть обработано и получено путем восстановления, ферментативного расщепления, денатурации или фрагментации перед контактом полученного образца с субстратом. Например, способы можно использовать для характеристики гликозилирования белков, например, терапевтических моноклональных антител (mAb), с помощью ЖХ-МС на уровне фрагментов и пептидов, таких как анализы HILIC-MS. В некоторых вариантах реализации, образцы на любой промежуточной стадии могут быть сконцентрированы, разбавлены, обессолены и т.п.

Гликопептид получают из гликозилированного белка, такого как моноклональное антитело. Гликозилированное моноклональное антитело может быть получено восстановлением, ферментативным расщеплением, денатурацией, фрагментацией, химическим расщеплением и их комбинацией. Описанные здесь способы применимы к антителам любого изотипа, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или к смешанному изотипу. Восстановление заключается в восстановлении дисульфидных связей до двух тиолов в 3-мерном белке, таком как моноклональное антитело. Восстановление можно проводить путем денатурации нагреванием, добавления поверхностно-активного вещества или добавления денатурирующего агента, например, гуанидина HCl (6M), в присутствии восстанавливающего агента, например, TCEP-HCl. Ферментативная деградация представляет собой расщепление белка протеазой, например, трипсином или протеазой *Achromobacter I* (Lys-C). Кроме того, гликопротеин может быть денатурирован нагреванием, химическими веществами или их комбинацией. Фрагментация включает расщепление белковых частей одного или нескольких субъединичных белков, таких как моноклональные антитела, физическими, биологическими или химическими способами.

В некоторых вариантах реализации, разделительная колонка представляет собой разделительную колонку для жидкостной хроматографии (ЖХ). Жидкостная хроматография, включая ВЭЖХ, может использоваться для анализа структур, таких как пептиды, включая гликопептиды. Для изучения этих структур можно использовать различные формы жидкостной хроматографии, включая анионообменную хроматографию, обращенно-фазовую ВЭЖХ, эксклюзионную хроматографию, высокоэффективную анионообменную хроматографию и нормально-фазовую (НФ) хроматографию, включая НФ-ВЭЖХ (см., например, Alpert et al., *J. Chromatogr. A* 676:191-202 (1994)). Хроматография гидрофильного взаимодействия (HILIC) представляет собой вариант NP-HPLC, который можно проводить с частично водными подвижными фазами, что позволяет разделять пептиды, углеводы, нуклеиновые кислоты и многие белки в нормальной фазе. Порядок элюирования для HILIC от наименее полярного до наиболее полярного, противоположный порядку в ВЭЖХ с обращенной фазой. ВЭЖХ можно проводить, например, на системе ВЭЖХ от Waters (например, система ВЭЖХ Waters 2695 Alliance), Agilent, Perkin Elmer, Gilson и т.д.

NP-HPLC, предпочтительно HILIC, представляет собой особенно полезную форму HPLC, которую можно использовать в описанных способах данного документа. NP-HPLC разделяет аналиты на основе полярных взаимодействий между аналитами и стационарной фазой (например, субстратом). Полярный аналит связывается с полярной неподвижной фазой и удерживается ею. Адсорбционная сила увеличивается с увеличением полярности аналита, а взаимодействие между полярным аналитом и полярной неподвижной фазой (по отношению к подвижной фазе) увеличивает время элюирования. Использование более полярных растворителей в подвижной фазе уменьшит время удерживания аналитов, в то время как более гидрофобные растворители обычно увеличивают время удерживания.

С NP-HPLC можно использовать различные типы субстратов, например, для колоночной хроматографии, включая субстраты из диоксида кремния, amino, амида, целлюлозы, циклодекстрина и полистирола. Примеры полезных субстратов, например, которые можно использовать в колоночной хроматографии, включают: полисульфоэтиласпартамид (например, от PolyLC), сульфобетаиновый субстрат, например, ZIC®-HILIC (например, от SeQuant), POROS® HS (например, от Applied Biosystems), POROS® S (например, от Applied Biosystems), полигидроэтиласпартамид (например, от PolyLC), Zorbax 300 SCX (например, от Agilent), PolyGLYCOPLEX® (например, от PolyLC), Amide-80 (например, от PolyLC), Tosohaas, TSK GEL® Amide-80 (например, от Tosohaas), полигидроксиэтил А (например, от PolyLC), Glyco-Sep-N (например, от Oxford GlycoSciences) и Atlantis HILIC (например, от

Waters). В некоторых вариантах реализации изобретения, раскрытые способы включают колонки, в которых используется одна или несколько из следующих функциональных групп: карбамоильные группы, сульфопропильные группы, сульфэтильные группы (например, поли(2-сульфэтиласпартамид)), гидроксэтильные группы (например, поли(2-гидроксэтил аспартамид)) и группы ароматической сульфоновой кислоты.

Температуру колонки можно поддерживать на постоянном уровне в течение всего цикла хроматографии, например, с помощью промышленного нагревателя колонки. В некоторых вариантах реализации, колонку поддерживают при температуре от около 18 до около 70°C, например, от около 30 до около 60°C, от около 40 до около 50°C, например, при температуре около 20, около 25, около 30, около 35, около 40, около 45, около 50, около 55, около 60, около 65 или около 70°C. В некоторых вариантах реализации, температура колонки составляет около 40°C.

Скорость потока подвижной фазы может составлять от около 0 до около 100 мл/мин. Для аналитических предложений скорость потока обычно находится в диапазоне от 0 до 10 мл/мин, для препаративной ВЭЖХ скорость потока может превышать 100 мл/мин. Например, скорость потока может составлять около 0,5, около 1, около 1,5, около 2, около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5 или около 5 мл/мин. Замена колонки с такой же насадкой, той же длиной, но меньшим диаметром требует уменьшения скорости потока, чтобы сохранить то же время удерживания и разрешение для пиков, что и для колонки большего диаметра. В некоторых вариантах реализации, используется скорость потока, эквивалентная приблизительно 1 мл/мин в колонке 4,6×100 мм, 5 мкм.

В некоторых вариантах реализации, время работы может составлять от около 15 до около 240 мин, например, от около 20 до около 70 мин, от около 30 до около 60 мин, от около 40 до около 90 мин, от около 50 мин до около 100 мин, от около 60 мин до около 120 мин, от около 50 до около 80 мин.

NP-HPLC можно настроить для проведения в наномасштабе, например, с использованием колонок с внутренним диаметром около 75 мкм (см., например, Wuhrer et al., *Anal. Chem.* 76:833-838 (2004); Wuhrer et al., *Internat. J. Mass. Spec.* 232:51-57 (2004)).

В некоторых вариантах реализации изобретения, разделительная колонка представляет собой разделительную колонку гидрофильного взаимодействия (HILIC), и молекулы, такие как гликопептиды, впоследствии элюируют из разделительной колонки HILIC, например, с использованием градиента подвижной фазы для разделения отдельных видов гликопептидов, тем самым очищая и/или разделение гликопептидов в образце. В некоторых примерах, элюированные гликопептиды из HILIC разделяют на одну или несколько фракций. Такие фракции могут быть использованы для последующего анализа, такого как MS-анализ. В некоторых вариантах реализации изобретения, способы включают идентификацию молекул, таких как гликопептиды и/или гликаны, присутствующих в одной или нескольких фракциях. В некоторых вариантах реализации изобретения, гликан представляет собой N-гликан или O-гликан. В некоторых вариантах реализации изобретения, способы дополнительно включают обнаружение гликопептида, например, с использованием УФ-сигнала от пептидной части гликопептида. Это может быть сделано для фракций образца и позволяет выбрать определенные фракции для дальнейшего анализа, например, масс-спектрометрического (МС) анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения, способы включают обнаружение гликанов с использованием сигналов FLR от флуоресцентных меток, связанных с гликанами.

В некоторых вариантах реализации изобретения, масс-спектрометрический анализ элюированных компонентов пробы включает применение ионизации электрораспылением для образования заряженных ионов из элюированных компонентов пробы и измерение образовавшихся заряженных ионов.

При применении масс-спектрометрии для анализа биомолекул молекулы переходят из жидкой или твердой фаз в газовую фазу и в вакуумную фазу. Поскольку многие биомолекулы являются большими и хрупкими (белки являются ярким примером), два наиболее эффективных способа их переноса в вакуумную фазу - это матричная лазерная десорбционная ионизация (MALDI) или ионизация электрораспылением (ESI). В целом, ESI более чувствителен, а MALDI быстрее. Примечательно, что некоторые пептиды ионизируются лучше в режиме MALDI, чем в режиме ESI, и наоборот (Genome Technology, June 220, p. 52). ESI выполняется путем смешивания образца с летучей кислотой и органическим растворителем и введения его через токопроводящую иглу, заряженную высоким напряжением. Заряженные капли, распыляемые (или выбрасываемые) с конца иглы, направляются в масс-спектрометр и по мере влета высушиваются под действием тепла и вакуума. После высыхания каплей оставшиеся заряженные молекулы направляются электромагнитными линзами в масс-детектор и масс-анализ. В одном варианте реализации изобретения, элюированный образец осаждается непосредственно из капилляра в сопло для электрораспыления, например, капилляр действует как загрузчик образца. В другом варианте реализации, сам капилляр действует как устройство для экстракции и сопло для электрораспыления. В некоторых вариантах реализации, способ усиливает масс-спектральный сигнал, как указано, в около 2-27 раз, например, в среднем в 5-14 раз, и/или приблизительно около 2-1000 раз увеличивает количество соединений с высоким зарядом (например, ≥ 3). В некоторых вариантах реализации, t глицин 1 мМ, когда количество загрузки образца составляет

10 мкг, кратность изменения составляет около 5. В некоторых вариантах реализации, спектральный сигнал увеличивается приблизительно в 14 раз и/или приблизительно в 1000 раз для частиц с высоким зарядом. Предполагается, что кратное усиление глицина может зависеть от количества загружаемого образца и концентрации глицина. Например, более высокая концентрация глицина приводит к более высокому усилению для различного количества загрузки образца, чем более низкая концентрация глицина, и общее усиление увеличивается с уменьшением количества загрузки образца. Существует определенная точка, ниже которой не наблюдается существенного изменения (<10%) в кратном увеличении количества загрузки (как показано на фиг. 1А, 1В и 2).

В некоторых вариантах реализации изобретения, используются другие режимы ионизации, например масс-спектрометрия с ионизацией турбораспылением, масс-спектрометрия с ионизацией нанораспылением, масс-спектрометрия с ионизацией термораспылением, масс-спектрометрия с ионизацией звуковым распылением, SELDI-MS и MALDI-MS. В целом преимущество этих способов заключается в том, что они позволяют проводить очистку пробы "точно в срок" и прямое введение в ионизирующую среду. Следует отметить, что различные режимы ионизации и детектирования накладывают свои собственные ограничения на природу используемого раствора для десорбции, и важно, чтобы раствор для десорбции был совместим с обоими. Например, матрица образца во многих случаях должна иметь низкую ионную силу или находиться в пределах определенного диапазона pH и т.д. В ESI соль в образце может помешать обнаружению за счет снижения ионизации или засорения сопла. Эта проблема решается путем представления анализируемого вещества с низким содержанием соли и/или использования летучей соли.

В некоторых вариантах реализации изобретения, субстрат готовят для добавления образца путем промывки, например стадии предварительной промывки. В некоторых вариантах реализации изобретения, субстрат промывают перед контактом с образцом гликопептида. В различных вариантах реализации изобретения, субстрат контактирует с образцом, содержащим биомолекулы, такие как гликопептиды, для обогащения. Что касается раствора образца, то он будет включать биомолекулы, такие как гликопептиды, растворенные в растворителе, в котором биомолекулы, такие как гликопептиды, растворимы, и в котором биомолекулы, такие как гликопептиды, будут связываться с субстратом. Предпочтительно связывание является прочным, что приводит к связыванию значительной части биомолекул, такой как значительная часть, включая более 50% биомолекул, например более 50% гликопептидов. В некоторых случаях будут связаны практически все, более 95% биомолекул, таких как гликопептиды. В различных вариантах реализации изобретения, растворитель представляет собой водный раствор, обычно содержащий буфер, соль и/или поверхностно-активные вещества для растворения и стабилизации биомолекул, таких как гликопептиды. В некоторых вариантах реализации изобретения, образец биомолекулы, такой как образец гликопептида, представляет собой раствор с низким pH ниже около 6,5, например ниже около 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 или 3,0.

В одном конкретном варианте способ усиления сигнала масс-спектра включает денатурацию и восстановление моноклонального антитела. Например, моноклональное антитело может быть денатурировано и восстановлено уксусной кислотой, такой как 5 мМ уксусной кислоты, в присутствии TCEP-HCl при нагревании в течение времени, достаточного для того, чтобы произошла денатурация и восстановление, например, при 80°C в течение 10 мин. После денатурации и восстановления образец алкилируют. В некоторых примерах образец сначала разбавляют, а затем алкилируют. Например, то же самое можно разбавить 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), содержащим 8М мочевины, а затем алкилировать йодацетамидом в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. После алкилирования образец дополнительно разбавляют для снижения концентрации мочевины, например, разбавляют 100 мМ три-HCl (pH 7,5) для снижения концентрации мочевины до уровня менее 1М. Затем образец расщепляют протеазой. Например, образец обрабатывают трипсином при соотношении фермента к субстрату 1:20 (вес/вес) при 37°C в течение 4 ч. В желаемое время расщепление останавливают, например, путем гашения образца TФУ, такой как 10% TФУ. Затем расщепленный образец подвергается онлайн-анализу ЖХ-МС. Например, образец триптического гидролизата (восстановленного/алкилированного) загружают в достаточной концентрации (например, 0,25 мкг), а градиент подвижной фазы А (MP-A) включает TФУ в H₂O с 1 до 2 мМ глицина, например TФУ в H₂O с 2 мМ глицина с последующим градиентом подвижной фазы Б TФУ в ACN с 1 до 2 мМ глицина, например, 0,05% TФУ в 80% ACN и 20% H₂O с 2 мМ глицина.

Примеры

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы данного изобретения считают созданным ими изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать возможность некоторых погрешностей эксперимента и отклонений. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно

25°C, а давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1: новый способ усиления сигнала ESI-MS с помощью добавки глицина.

Триптический гидролизат NISTmAb: 100 мкг NISTmAb денатурировали и восстанавливали в 5 мМ уксусной кислоты в присутствии 5 мМ TCEP-HCl при 80°C в течение 10 мин. После денатурации и восстановления образец разводили 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5), содержащим 8М мочевины, и алкилировали йодацетамидом в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. После алкилирования образец дополнительно разбавляли 100 мМ Tris-HCl (pH 7,5) для снижения концентрации мочевины до уровня менее 1М. Образец инкубировали с трипсином при соотношении фермента к субстрату 1:20 (мас./мас.) при 37°C в течение 4 ч. Расщепленный образец гасили добавлением 10% ТФУ, чтобы остановить расщепление трипсином, а затем подвергали онлайн-анализу ЖХ-МС. NISTmAb Триптический гидролизат (восстановленный/алкилированный) загружали в различных количествах 0,05-10 мкг, МР-А: 0,05% ТФУ, 0,0625-5 мМ глицина в H₂O, МР-В: 0,05% ТФУ, 0,0625-5 мМ глицина в 80% ACN и 20% H₂O, где колонка была ACQUITY UPLC Peptide BEH C18, 130 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм x150 мм (Waters) и условия ЖХ: 0,25 мл/мин, температура колонки 40°C.

Для исследования различных низкомолекулярных реагентов при усилении MS (как показано на фиг. 3) триптический гидролизат NISTmAb (восстановленный/алкилированный) загружали в концентрации 0,25 мкг, МР-А: 0,05% ТФУ в H₂O, МР-В: 0,045% ТФУ в ACN, где колонка пептид ACQUITY UPLC BEH C18, 130 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм x150 мм (Waters) и условия ЖХ: 0,25 мл/мин, температура колонки 40°C, шприцевой насос использовался для подачи 125 мМ различных растворов малых молекул в 50: 50 H₂O/ACN со скоростью 10 мкл/мин для смешивания с элюентом из ЖХ-колонки, и конечная концентрация малых молекул составляла приблизительно 5 мМ.

В табл. 1 представлены %А и %В в различные моменты времени.

Таблица 1

Время (мин)	%А	%В
0	99,9	0,1
5	99,9	0,1
47	65,0	35,0
48	0,1	99,9
54	0,1	99,9
55	99,9	0,1
60	99,9	0,1

Фиг. 1А и 1В иллюстрируют влияние глицина в различных концентрациях на усиление MS и влияние различных количеств загрузки образца на усиление MS. Фиг. 1А и 1В были получены путем прямого добавления глицина во флаконы с подвижной фазой ТФУ (МФК: 0,05% ТФУ в воде и глицине; МФБ: 0,05% ТФУ в 80% ACN и 20% воды и глицина), а не после колонки. конфигурация шприцевого насоса. На фиг. 1А показана четкая зависимость усиления глицина от количества загрузки образца. Была необходима более высокая концентрация глицина для большего количества загрузки, чтобы получить такое же кратное усиление, как и при более низкой концентрации глицина для меньшего количества загрузки.

На фиг. 1В показано, что увеличение количества загружаемого образца в целом снижает усиливающую способность глицина на реакцию пептидов. Глицин в концентрации 2 мМ демонстрировал более сильное усиление, чем в концентрации 1 мМ, при различных объемах загрузки образца. Кроме того, по мере уменьшения количества загрузки образца тенденция к увеличению кратности постепенно замедлялась. Минимальное изменение (<10%) кратности бустирования с количеством загрузки наблюдалось, когда количество загрузки образца было ниже 0,2 и 0,5 мкг при концентрациях глицина 1 и 2 мМ соответственно.

Хотя снижение усиления кратности наблюдалось при увеличении количества загружаемого образца, отклики масс-спектрометрии (т.е. пиковые зоны EIC пептидов) были все еще выше при более высоком количестве загрузки, чем при более низком количестве загрузки, даже при более высоком кратном усилении.

На фиг. 2 представлена химическая структура десять аминокислот на основе различных химических свойств их боковых цепей, включая аланин и валин (гидрофобная боковая цепь), серин (гидрофильная боковая цепь), пролин (циклическая боковая цепь), метионин (серосодержащая боковая цепь), глутамин (амидсодержащая боковая цепь), глутаминовая кислота (кислая боковая цепь), лизин и аргинин (основная боковая цепь) и гистидин (ароматическая боковая цепь), а также несколько вариантов глицина, полученных путем модификации глицина по аминокислотной группе (например, N,N-диметилглицин, N-ацетилглицин, N-метилглицин и пропионовая кислота), боковая цепь (например, 3,3,3-трифтор-DL-аланин) или карбоксильная группа (например, этиламин) или вставка глицина с дополнительными атомами углерода для увеличения расстояния между амином и карбоксильными группами (например, β-

аланин и γ -аминоасляная кислота).

Фиг. 3 представляет собой график, иллюстрирующий среднее кратное усиление MS1 триптических пептидов NISTmAb различными низкомолекулярными реагентами (2 мМ). Как показано на фиг. 3, глицин показал самое высокое среднее усиление. Глицин также является молекулой с наименьшей молекулярной массой.

Фиг. 4 представляет собой кривую, иллюстрирующую минимальное изменение хроматографического разделения пептидов после добавления глицина к буферам ТФУ. Условия исследований: загрузка 2,5 мкг триптического гидролизата NISTmAb (восстановленного/алкилированного); МР-А: 0,05% ТФУ в H₂O с 2 мМ глицина или без него, МР-В: 0,05% ТФУ в 80% АСН и 20% H₂O с 2 мМ глицина или без него, колонка Acquity UPLC Peptide ВЕН С18, 130 А, 1,7 мкм, 2,1 мм \times 150 мм (вода с условиями ЖХ 0,25 мл/мин, температура колонки 40°C. Отмечено, что МР-В был изменен с обычных условий 0,05% ТФУ в АСН на 0,05% ТФУ в 80% АСН и 20% H₂O из-за проблем с растворимостью 2 мМ глицина в 100% АСН. В табл. 2 ниже приведены показатели эффективности UPLC для 8 репрезентативных пептидных пиков (Р1-Р8), выбранных на УФ-хроматограмме (см. фиг. 4) по всему градиенту LC, демонстрируя очень сопоставимые показатели производительности UPLC между двумя системами с подвижной фазой с разницей во времени удерживания <0,06 мин, разницей в % ширины пика <1,4% и разницей в % площади пика <1,9%. Ширина пика - соответствующая ширина основания пика, полученная путем проведения касательных линий на высоте 50% пика; В табл. 3 представлены %А и %В в различные моменты времени.

Таблица 2

Представленный Пик	Контроль ТФУ			ТФУ с глицином			Сравнительная статистика		
	Время удерживания (мин)	Ширина пика (мин)	Зона пика	Время удерживания (мин)	Ширина пика (мин)	Зона пика	Разница времени удерживания (мин)	Ширина пика % разницы	Зона пика, % разницы
P1	9,78	0,08	59679	9,76	0,09	59188	0,02	0,2%	0,8%
P2	14,75	0,07	64700	14,72	0,07	64335	0,03	0,3%	0,6%
P3	19,08	0,07	66250	19,05	0,07	66202	0,03	0,6%	0,1%
P4	19,32	0,08	103940	19,29	0,08	103120	0,03	0,0%	0,8%
P5	24,25	0,10	95242	24,21	0,10	94117	0,04	0,2%	1,2%
P6	29,99	0,08	64337	29,93	0,08	65571	0,06	1,4%	1,9%
P7	35,98	0,09	235272	35,92	0,09	235951	0,06	0,1%	0,3%
P8	41,89	0,09	393689	41,85	0,09	395706	0,04	0,2%	0,5%

Таблица 3

Время (мин)	%А	%В
0	99,9	0,1
5	99,9	0,1
47	50,0	50,0
48	0,1	99,9
54	0,1	99,9
55	99,9	0,1
60	99,9	0,1

Фиг. 5 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую воспроизводимость усиления 2 мМ глицина в буферах ТФУ с загрузкой 0,25 мкг NISTmAb с 10 повторами каждого образца. Наблюдалось пептидозависимое усиление ответа, а кратное усиление различных триптических пептидов находилось в широком диапазоне от 2 до 27 раз, в среднем приблизительно в 13,2 раза. Большинство пептидов демонстрировали повышение ответа по меньшей мере в 5 раз, при этом более половины пептидов демонстрировали даже более чем 10-кратное усиление. Среднее увеличение составило 13,2х и % относительного стандартного отклонения (RSD) был менее 5% для всех пептидов. Фиг. 6 представляет собой график полного ионного тока (ТИС), иллюстрирующий отношение сигнал-шум, наблюдаемое с контролем ТФУ и ТФУ в присутствии глицина, с загрузкой 2,5 мкг NISTmAb. Десять репрезентативных триптических пептидов с разным временем удерживания по всему градиенту LC были выбраны для сравнения их отношений сигнал-шум на хроматограммах суммарных ионов между подвижными фазами ТФУ с добавкой глицина и без нее. Соотношение сигнал-шум действительно повышалось с добавкой глицина для этих десяти триптических пептидов. Подобно пептидозависимому усилению ответа,

выбранные пептиды также продемонстрировали различное усиление отношения сигнал-шум в широком диапазоне до более чем одного порядка величины. Добавка глицина усиливала масс-спектрометрические отклики триптических пептидов, однако усиления фонового шума, обусловленного низкомолекулярными загрязнителями, генерируемыми из окружающей среды во время ионизации электрораспылением, не наблюдалось. Эта функция усиления может привести к улучшению отношения сигнал-шум триптических пептидов, в то время как абсолютные ответы были усилены.

Таблица 4

Представленный Пик	Время удерживания (мин)	Соотношение Сигнал-шум		Кратное увеличение
		Контроль ТФУ	ТФУ с глицином	
P1	11,7	4	23	5,8
P2	14,7	3	33	11,0
P3	18,3	9	62	6,9
P4	23,9	16	74	4,6
P5	27,7	17	174	10,2
P6	29,5	17	167	9,8
P7	30,6	25	214	8,6
P8	33,5	10	51	5,1
P9	37,9	8	97	12,1
P10	41,1	14	68	4,9

Фиг. 7, 8А и 8В гистограммы, иллюстрируют изменение состояния заряда в присутствии глицина. % RSD менее 0,4% для всех пептидов; 10 повторов. Среднее смещение состояния заряда зависело от пептида, и наблюдалось как смещение вверх, так и смещение вниз.

Фиг. 9 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую количественный анализ РТМ% в присутствии и в отсутствие 2 мМ глицина (буферы ТФУ, загрузка NISTmAb 0,25 мкг), 10 повторов.

Фиг. 10 представляет собой гистограмму, иллюстрирующую кратность усиления за счет присутствия глицина с ТФУ или FA или только FA по сравнению с контролем ТФУ, 3 повтора. Как показано на фиг. 10, ТФУ в присутствии 2 мМ глицина приводила к 13,2-кратному усилению по сравнению с 12,3-кратным усилением, наблюдаемым с FA в присутствии 2 мМ глицина или 6,1-кратным с FA.

Фиг. 11 представляет собой график, иллюстрирующий кратное усиление отдельных аминокислот с помощью 2 мМ глицина (колонка: Discovery HS F5-3, 15 см ×2,1 мм, 3 мкм (Supelco); загрузка каждой аминокислоты 1 нмоль).

Фиг. 12 иллюстрирует влияние следовых количеств натрия в коммерческих составах глицина.

Оценивали усиление сигнала ESI-MS с помощью добавки глицина для количественного определения белка.

На фиг. 13 представлено сравнение количественного определения пептида STSGGTAALGCLVK (SEQ ID NO: 22) с использованием PRM и полного сканирования. Тот же линейный диапазон ответа на три порядка величины наблюдался для ТФУ и FA с подвижными фазами глицина с аналогичным наклоном регрессии для ТФУ и контрольных подвижных фаз FA, что указывает на последовательное усиление ответа глициновой добавкой в широкой концентрации белка. Из-за усиления отклика глициновой добавкой в подвижных фазах ТФУ и FA линейный диапазон отклика также достигал более низкой концентрации белка по сравнению с контрольными подвижными фазами ТФУ и FA. Эта функция может открыть возможность для рассмотрения подвижных фаз на основе глицина в качестве альтернативы для количественного определения белков с низким содержанием в сложных матрицах с повышенной чувствительностью.

Пример 2: усиление сигнала ESI-MS с помощью добавки глицина: идентификация и количественный анализ гликопептидов на основе IP-HILIC-MS.

На фиг. 14 показаны преимущества жидкостной хроматографии на основе HILIC по сравнению с обращенной фазой для анализа гликопептидов. Пептиды получали стандартными способами картирования восстановленных или невосстановленных пептидов. Как показано на фиг. 14, лучшее разделение гликопептидов было получено в HILIC, тогда как кластеризация гликопептидов наблюдалась в обращенной фазе. Например, большее разделение изомеров, таких как G1F, наблюдалось при использовании IP-HILIC по сравнению с обращенной фазой. Более того, порядок элюирования гликопептида на колонке HILIC коррелировал с размером гликанов, присоединенных к пептиду, что позволяет легко отличить артефакты, генерируемые фрагментацией больших гликанов в источнике, от реального пика (неперекрывающиеся отдельные времена элюирования).

Фиг. 15 иллюстрирует усиление сигнала, наблюдаемое в буфере с добавлением глицина как для MS1, так и для MS2. Образец представлял собой расщепленные трипсином объединенные партии ловушек VEGF IND, колонка: Waters BEH-Amide и подвижная фаза: А: 0,1% ТФУ и В: 80% ACN+0,1% ТФУ.

Фиг. 16 иллюстрирует предотвращение связывания высокой концентрацией глицина.

На фиг. 17 представлена примерная схема рабочего процесса подготовки пробы для анализа гликопептидов с помощью ЖХ на основе HILIC.

Фиг. 18 иллюстрирует эффект обессоливания, при котором обессоление с помощью картриджа SepPak 30 устранило повышенный базовый уровень (см. стрелку). Элюирование пептидов подвижной фазой В (0,1% ТФУ в 80% ацетонитриле) исключает стадию сушки после обессоливания, тем самым экономя время и повышая эффективность процесса. Исследования также показали, что аддукты металлов могут быть уменьшены при использовании полиэтиленового контейнера для растворителя (например, полиэтиленовой бутылки от Belart) во время подвижных фаз по сравнению со стеклянной бутылкой. Увеличение интенсивности в 2,7 раза и увеличение интенсивности в 1,7 раза наблюдалось при использовании пластиковой бутылки по сравнению со стеклянной бутылкой во время подвижных фаз. Считается, что пластиковая бутылка уменьшила неоднородность, вызванную натрием, и, таким образом, усилила сигнал MS. Кроме того, бутылки с растворителем, замоченные на ночь в 60% изопропиловом спирте, удаляли выселяемые примеси/отвердители.

На фиг. 19 и 20 представлены таблицы, иллюстрирующие действие глицина. На фиг. 19 показано, что глицин увеличивает площадь пика всех гликоформ в 20 раз в IGG1 (*гликоформы в этой таблице были идентифицированы только на основе тандемной MS в любом опыте; ** для гликоформ, по которым нет данных тандемной MS, таким образом, пик определяли на основе массы предшественника и времени удерживания, определенных в других анализах (показаны в столбце, обозначенном как Пептид 1_Контроль)). На фиг. 20 представлена площадь пика всех гликоформ в молекуле IGG4 (*гликоформы в этой таблице были идентифицированы только на основе тандемной MS в любом опыте; ** для гликоформ, для которых нет данных тандемной MS, пик был определен на основе массы предшественника и время удерживания, определенные в других экспериментах (показаны в столбце, обозначенном как контрольный пептид 2; *** кратное изменение гликоформы, содержание которой ниже LLOQ в контрольном эксперименте, даст завышенное число (показано в скобках)).

На фиг. 21 представлена зона пика всех гликоформ в оцениваемых mAb. Относительное распределение всех гликоформ в присутствии глицина оставалось одинаковым.

Фиг. 22 иллюстрирует повышенную способность к фрагментации за счет сдвига состояния заряда в присутствии 1 мМ глицина. Основной заряд гликопептида сместился с +2 на +3, последний легко фрагментируется. Наблюдалось усиление сигнала при добавлении глицина (1 мМ) для VEGF TRAP. Глицин увеличивал количество совпадений пептидного спектра (PSM) и гликоформ в VEGF TRAP (см. фиг. 23).

Пример 3: усиление сигнала ESI-MS с помощью добавки глицина: анализ вариантов последовательности.

Этот пример демонстрирует способность глицина в ТФУ увеличивать количество вариантов последовательности. Количество вариантов последовательности, идентифицированных при использовании ТФУ+глицин по сравнению с FA после биологической проверки, показано на фиг. 24.

Пример 4: усиление сигнала ESI-MS с помощью добавки глицина: анализ гликанов.

После высвобождения из гликопротеинов N-гликаны могут быть помечены различными флуоресцентными метками, которые часто также усиливают ответ MS. Меченые или восстановленные N-гликаны можно анализировать способом HILIC с подвижными фазами, содержащими соли, например, формиат аммония. Было обнаружено, что глицин 1 мМ в подвижной фазе, усиливает сигналы MS от N-гликанов, маркированных PROCA, из сыворотки человека (в 3-50 раз) (см. фиг. 25 и фиг. 26A-26B). Глицин оказывал более сильное влияние на высокое содержание маннозы и большие кислые N-гликаны (более чем в 10 раз). Используя подвижные фазы формиата аммония без глицина, MS профиль N-гликанов, маркированных PROCA, показал некоторое отличие от профиля FLR, который широко используется для количественного определения гликанов (см. фиг. 27 и фиг. 28A-28C). Высокое содержание маннозы и большие N-гликаны с тремя сиаловыми кислотами имели относительно более низкие сигналы MS, тогда как разделенные пополам N-гликаны имели относительно более высокие сигналы MS при сравнении профилей MS и FLR. При добавлении глицина в подвижные фазы сигналы MS были не только выше, но и более сопоставимы с FLR (см. фиг. 27 и фиг. 28A-B).

На фиг. 29 показана диаграмма рассеяния N-гликанов сыворотки с меткой PROCA: площади пиков EIC в сравнении с площадями пиков FLR (логарифмическая шкала) в контроле и в условиях, содержащих глицин. Меньшее значение R-квадрата линейной регрессии для условий с глицином по сравнению со значением для контрольных условий демонстрирует, что глицин может повысить точность количественного определения N-гликанов с использованием сигналов MS. Сильный эффект усиления сигнала глицином на N-гликанах, маркированных PROCA, также можно наблюдать при использовании подвижных фаз, содержащих 0,1% FA (кратность 3-38) (см. фиг. 30A-30C). Глицин также продемонстрировал умеренный эффект усиления сигнала в отношении N-гликанов, маркированных RapiFluor, и N-гликанов с небольшим уменьшением (в 1-3 раза) при использовании подвижных фаз формиата аммония (см. фиг. 31A-31C и фиг. 32). Наблюдался ингибирующий эффект в отношении более крупных восстановленных N-гликанов (фиг. 32). Относительные уровни крупных N-гликанов, маркированных RapiFluor, основанные на площадях пиков MS и площадях пиков FLR, были более

сопоставимы при использовании условий с глицином по сравнению с таковыми в контрольных условиях (фиг. 32).

На фиг. 33 представлены иллюстративные условия LC-FLR-MS для анализа N-гликанов.

В отличие от N-гликанов, не существует удовлетворительного способа высвобождения O-гликанов из-за отсутствия высвобождающего фермента и проблем с эффективностью высвобождения и снижения конечного разложения O-гликанов посредством химического высвобождения.

На фиг. 34 представлен типичный способ получения и анализа O-гликанов с помощью ЖХ-МС и флуоресцентного (ФЛР) детектирования.

Фиг. 35 иллюстрирует результат маркированных PROCA O-гликанов из бычьего подчелюстного муцина (BSM) 2 мкг на колонке, флуоресценции и оптимизированного восстановительного аминирования.

На фиг. 36 показано, что профили TIC FL и MS TIC для O-гликанов, маркированных PROCA, в высокой степени сопоставимы. O-гликаны, маркированные PROCA, высвобождаемые из BSM, анализируют на HILIC (соответствует 2 мкг на колонку). Наблюдался низкий фон MS. Было обнаружено, что глицин, 1 мМ в подвижной фазе, усиливает действие на O-гликаны BSM, маркированные PROCA, очищенные от гранул (2 мкг на колонке, фиг. 37А-Б).

На фиг. 37А-37В представлены результаты сравнения интенсивностей пиков O-гликанов FLR и MS с глицином и без него в подвижных фазах. По сравнению с FLR сигналы PROCA значительно снижаются с увеличением размера гликанов. Глицин компенсировал этот эффект и сделал сигналы MS более сопоставимыми с интенсивностью FLR (фиг. 37А-37В). Глицин имел умеренный эффект усиления (в 1-3 раза) в отношении малых (1-2 сахарных кольца) O-гликанов (см. фиг. 38А-38С). Глицин оказывает сильное стимулирующее действие на более крупные и/или кислые гликаны (в 3-35 раз), маркированные PROCA (см. фиг. 38А). Эффекты были сильными для несущих две сиаловые кислоты (>35 раз). Наблюдалось, что глицин оказывает умеренное усиливающее действие на O-гликаны BSM, маркированные 2AB (<3 раз) (см. фиг. 38В). MS-сигналы небольших восстановленных O-гликанов могут быть усилены глицином до 12 раз (см. фиг. 38С). Однако наблюдалось ингибирующее действие на более крупные восстановленные O-гликаны.

На фиг. 39 представлены типичные условия LC-FLR-MS для анализа маркированных PROCA или восстановленных O-гликанов.

На фиг. 40 показано, что однозарядный гликан обеспечивает плохой MS2 в отсутствие глицина.

На фиг. 41 показано, что двухзарядные ионы из образца, усиленного глицином, обеспечивают значительно расширенную информацию о MS2.

Пример 5: добавка глицина в подвижные фазы, содержащие трифторуксусную кислоту, облегчает профилирование сайт-специфического гликозилирования биофармацевтических препаратов с помощью ион-парной хроматографии гидрофильных взаимодействий масс-спектрометрии.

Многие биотерапевтические препараты, такие как моноклональные антитела (mAb) и слитые белки с Fc-доменом, содержат гетерогенные гликаны в одном или нескольких сайтах гликозилирования. Характеристика профиля гликанов для конкретных сайтов имела решающее значение для мониторинга качества этих молекул на разных этапах разработки лекарств. Ионно-парная гидрофильная взаимодействующая хроматография (IP-HILIC) в качестве ортогонального способа разделения обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (RPLC), может обеспечить лучшее разделение между отдельными гликоформами, а также идентификацию гликопептидов из негликозилированных пептидов. Однако онлайн-IP-HILIC, связанный с масс-спектрометрическим детектированием, может страдать от подавления сигнала масс-спектрометрии во время ионизации электрораспылением из-за трифторуксусной кислоты (ТФУ), обычно используемой в качестве агента ионного сопряжения. В этом примере сообщается об оптимизированных условиях для IP-HILIC-MS, где глицин добавляется в содержащие ТФУ подвижные фазы для повышения чувствительности MS к обнаружению гликопептидов приблизительно в 50 раз за счет устранения эффекта подавления ионов у ионно-парного агента, сохраняя при этом превосходную разделительную способность. Показано, что с повышенной чувствительностью обнаружения IP-HILIC-MS может идентифицировать увеличенное количество сайт-специфических N-связанных гликанов для mAb IgG1 и IgG4, а также слитый белок с Fc-доменом (содержащий пять сайтов N-гликозилирования) и достичь сопоставимых количественных результатов по сравнению с традиционным способом с использованием масс-спектрометрии RPLC (RPLC-MS). Также продемонстрировано, что IP-HILIC-MS можно использовать для выявления низкого уровня O-гликозилирования и неконсенсусного N-гликозилирования на mAb без какого-либо обогащения перед анализом LC-MS.

I. Введение.

Гликозилирование является важным атрибутом качества биотерапевтических средств, включая моноклональные антитела (mAb) и слитые белки с Fc-доменом (домен кристаллизации фрагмента). Профиль гликозилирования Fc-домена в консервативном сайте аспарагина-297 тесно связан с эффекторными функциями, такими как антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), которые могут влиять на эффективность лекарственного

средства при онкологической терапии. Хотя N-гликозилирование Fc не принимает непосредственного участия во взаимодействии с мишенями, N- или O-связанные гликаны в неканоническом сайте, который часто находится в области Fab (антигенсвязывающего фрагмента) mAb или функциональных доменов сшитый белок с Fc-доменом может оказывать негативное влияние на аффинность связывания с мишенями. Гликозилирование в биотерапевтических препаратах также коррелирует с фармакокинетическими и фармакодинамическими профилями и другими молекулярными свойствами, такими как гетерогенность заряда, стабильность и иммуногенность. Поскольку гликозилирование белков слияния mAb или Fc-доменов часто проявляет универсальные профили в различных системах экспрессии белков, производственных процессах и белковых последовательностях, всесторонняя характеристика сайта-специфического профиля гликанов включает ряд основных задач, включая демонстрацию сопоставимости профилей гликанов среди различных образцов или исследование основной причины проблем, связанных с гликозилированием, во время доклинической разработки биофармацевтических препаратов.

Профилирование N-связанного гликозилирования может быть выполнено путем последовательного высвобождения гликанов из белков с помощью обработки экзогликозидазой, мечения редуцированных концов флуоресцентными реагентами и анализа высвобожденной смеси гликанов с использованием хроматографии гидрофильных взаимодействий в сочетании с детектированием флуоресценции и масс-спектрометрии (HILIC-FLR-MS), однако он не может предоставить информацию о сайт-специфическом гликозилировании, если белок содержит несколько сайтов гликозилирования. Вместо этого прямой анализ интактных гликопептидов может выявить сайт-специфические профили гликозилирования как для N-, так и для O-связанных гликанов. В типичном рабочем процессе идентификации гликопептидов белок расщепляется протеазой и анализируется с использованием обращенно-фазовой хроматографии (RPLC) в сочетании с масс-спектрометрией. Это подход, используемый для характеристики биофармацевтических препаратов, чтобы подтвердить аминокислотную последовательность белка и обеспечить количественный анализ в зависимости от сайта после посттрансляционных и химических модификаций, включая гликозилирование (часто называемое "пептидным картированием"). Относительное содержание отдельных гликанов может быть определено количественно на основе зон пиков на хроматограммах извлеченных ионов (EIC) соответствующих гликопептидов. Однако разделение гликопептидов на основе RPLC в основном зависит от аминокислотной последовательности, поскольку гликановые композиции мало влияют на разницу в гидрофобности, что может привести к следующему: (1) гликоформы из пептида с той же аминокислотной последовательностью элюируются в виде кластера пиков, время удерживания которых близко друг к другу; (2) гликопептиды нельзя хорошо отличить от других негликозилированных пептидов, если их пептидные последовательности имеют схожую гидрофобность. Например, сигнал MS гликопептида с низким содержанием из атипичного N- или O-связанного сайта гликозилирования может быть значительно подавлен в присутствии совместно элюирующихся интерференционных видов с высоким содержанием из других гликопептидов или негликозилированных пептидов из-за ограничения MS динамического диапазона обнаружения и емкости загрузки колонки.

В отличие от RPLC, HILIC реализует эффективное разделение гликанов различного состава и структурных изомеров. HILIC в сочетании с масс-спектрометрией использовался для анализа N-гликанов, высвобождаемых из одного биотерапевтического или гликомикологического анализа в различных типах сложных образцов. Также сообщалось об анализе интактных гликопептидов с использованием HILIC-MS, который проводился в умеренно кислой среде, на антитела и другие гликопротеины, которые продемонстрировали превосходное разделение для различных гликоформ, включая изомеры гликанов. Гликопептиды можно лучше отделить от негликозилированных пептидов, просто изменив подвижные фазы HILIC с добавлением 0,1% ТФУ, что обеспечивает кислую среду (pH приблизительно 2) и сильное образующие ионную пару свойство (анион ТФУ). При этом условии, заряженные группы пептидов могут быть нейтрализованы, что значительно снижает гидрофильность негликозилированных пептидов, в то время как гликопептиды менее подвержены влиянию, поскольку гликаны богаты незаряженными полярными фрагментами, такими как гидроксильные группы. Хотя ион-парное разделение HILIC (IP-HILIC) стало стандартным способом автономного обогащения гликопептидов в бесчисленных гликопротеомных исследованиях, прямое сочетание IP-HILIC с MS-детектированием для идентификации гликопептидов встречается редко из-за неблагоприятного подавления сигнала, вызванного ион-связывающим агентом ТФУ, который может вызывать снижение сигнала MS в 5-10 раз по сравнению с муравьиной кислотой при той же концентрации. Таким образом, восстановление подавления нежелательных ионов является ключом к расширению области применения в подходе IP-HILIC-MS с использованием ТФУ.

В последние десятилетия были предприняты многочисленные попытки смягчить подавление сигнала MS, связанное с ТФУ, начиная от введения "фиксирующего раствора" после колонки и заменяя заменой ТФУ другими "более слабыми ионно-связывающими" агентами. Был открыт способ прямого добавления глицина к содержащим ТФУ подвижным фазам, приводящий к значительному улучшению приблизительно на 1 порядок отношения сигнал-шум (S/N) при пептидном картировании

mAb с использованием зарезервированной фазы C18 колонки. Хотя добавка глицина была введена перед колонкой, она не повлияла на эффективность разделения пептидов на колонке C18. В настоящем примере показано, что это решение также может быть применено к IP-HILIC-MS, что позволяет создать высокочувствительную и устойчивую платформу для беспристрастного профилирования сайт-специфического гликозилирования для моноклональных антител или белков слияния Fc-домена. Также описан уникальный пример того, как эта платформа может избирательно улучшить возможность выявления крайне малораспространенного O-связанного и неконсенсусного N-связанного гликозилирования в Fab-области mAb без дополнительного автономного обогащения перед анализом LC-MS.

II. Материалы и эксперименты.

Реактивы и материалы.

Четыре моноклональных антитела IgG4 (mAb1, mAb2, mAb3, mAb4), моноклональное антитело IgG1 (mAb5) и слитый белок с Fc-доменом (fP1) были получены в Regeneron (Tarrytown, NY). Сверхчистый глицин (марка J.T. Baker), трифторуксусная кислота (степень чистоты для секвенирования), муравьиная кислота (степень чистоты для секвенирования) и ацетонитрил (степень чистоты для ЖХ-МС) были приобретены у Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Формиат аммония (99%) был приобретен у Acros Organics™. PNGase F был приобретен в New England Biolabs (Ipswich, MA). Набор для быстрого дегликозилирования GlycoWorks™ был приобретен у Waters (Milford, MA). Сверхчистая вода была получена с помощью системы Milli-Q (Millipore, Burlington, MA). Все другие химикаты были приобретены у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), если не указано иное.

Расщепление трипсином.

Для приготовления белковых гидролизатов моноклональные антитела денатурировали и восстанавливали в растворе, содержащем 5 мМ уксусной кислоты и 5 мМ трис (2-карбокситетилфосфингидрохлорид), нагревая при 80°C в течение 10 мин. Затем каждый образец нейтрализовали в 100 мМ Трис-буфере, pH 8,0, содержащем 15 мМ йодацетамида, с последующим расщеплением трипсином при соотношении фермента к субстрату 1:20 (мас./мас.) при 37°C в темноте в течение 2 ч. Для слитого белка с Fc-доменом белок восстанавливали и денатурировали в присутствии 8 М гуанидин-HCl и 5 мМ дитиотреитола путем нагревания при 80°C в течение 10 мин с последующим алкилированием 15 мМ йодацетамидом. Образец был заменен буфером на 100 мМ Трис, pH 8,0, с использованием колонки NAP-5 Sephadex 5-25 (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс), а затем расщеплен при тех же условиях расщепления, что и моноклональные антитела. Расщепленные пептиды дополнительно очищали с помощью картриджей Sep-Pak C18 (Waters) в соответствии с протоколом, предоставленным поставщиком. Образцы сушили в вакууме и восстанавливали в 80% ACN (для HILIC-MS) или в воде (для RPLC-MS).

ЖХ-МС анализ гликопептидов.

Все эксперименты ЖХ-МС проводились с использованием системы Acquity UPLC I-Class (Waters), соединенной с масс-спектрометром Q-Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap, оснащенный источником с нагретой электрораспылительной ионизацией (HESI) (Thermo Fisher Scientific). Для минимизации образования щелочных аддуктов, все пробы переносили в полипропиленовые флаконы, предназначенные для инъекций, растворы подвижной фазы готовили и хранили в полиэтиленовых бутылках, а линии ЖХ предварительно тщательно очищали. Подвижная фаза А (MPA) представляет собой чистую водную фазу, содержащую 100% воды (об./об.), 0,1% ТФУ или МК (об./об.) и 1 мМ глицина. Подвижная фаза Б (MPB) состояла из 80% ацетонитрила (об./об.), 20% воды (об./об.), 0,1% ТФУ или МК (об./об.) и 1 мМ глицина. Безглициновая версия MPA и MPB также была изготовлена по тому же рецепту с эквивалентным количеством воды вместо добавления глицина.

Перед первым вводом образца после переключения подвижных фаз между версией с глицином и без глицина систему ЖХ кондиционировали в течение не менее 1 ч и отслеживали интенсивность пика МС для протонированного глицина при 76,07 m/z (диапазон сканирования 50-750 m/z) в целях контроля качества ожидалось, что стабильные сигналы МС достигнут нормализованной интенсивности при $1e^6$ и $1e^9$ для подвижных фаз без глицина и с глицином соответственно.

Для анализа HILIC-MS 6 мкг (или большее количество, если указано) обессоленных пептидов, расщепленных трипсином, загружали в колонку Waters Acquity UPLC Glycan BEH Amide (130Å, 1,7 мкм, 2,1 мм × 150 мм). Поток начинали с 99,9% MPB со скоростью 0,2 мл/мин, и гликансодержащие пептиды элюировали и разделяли, когда процентное содержание MPB снижалось с 90 до 62,5%. Для анализа RPLC-MS образцы загружали в колонку Waters Acquity UPLC BEH C18 (130 Å, 1,7 мкм, 2,1 мм × 150 мм). Настройка подвижных фаз для анализа RPLC-MS полностью идентична HILIC-MS, но, напротив, поток начинался при 99,9% MPA, а элюирование пептидов происходило при повышении процентного содержания MPB с 0,1 до 40%. Полные МС-сканы были собраны в диапазоне от 500 до 2000 m/z, чтобы избежать сигналов глицина, разрешение=70 000, цель AGC= $1e^6$, максимальное IT=100 мс, защитный газ =40, вспомогательный газ =10, продувочный газ =0, напряжение распыления =3,8 кВ, температура капилляра =350°C, температура вспомогательного газового нагревателя =250°C, уровень RF S-линзы

=50. Пять наиболее распространенных прекурсоров были выбраны для сканирования MS2 в зависимости от данных, где NCE было установлено на 27, разрешение =17500, цель AGC=5e⁵, максимальное IT=250 мс.

Обработка данных для идентификации гликопептидов.

Идентификацию гликопептидов проводили с использованием программного обеспечения Wunic в пакете Protein Metrics путем поиска необработанных файлов по последовательности белков и встроенной базе данных гликанов, содержащей 132 человеческих N-связанных гликана или 70 обычных O-связанных гликанов. Для неконсенсусного поиска N-гликанов та же самая база данных N-гликозилирования была настроена для устранения ограничения по сайту в соответствии с примечаниями по способике, предоставленными поставщиком. Предварительный список уникальных гликопептидов был сформирован путем фильтрации против 1% FDR. Затем список прекурсоров, а также исходный результат поиска в виде библиотеки спектров был импортирован в программное обеспечение Skyline Daily (Вашингтонский университет, штат Вашингтон) для полной проверки окончательной идентификации и количественной оценки на основе сканирования посредством автоматического выделения признаков и интеграции пиков.

HILIC LC-MS анализ дериватизированных гликанов.

Для подготовки образцов для анализа высвобожденного N-гликана белок денатурировали и восстанавливали в растворе, содержащем 0,1% RapiGest™ SF (Waters) и 4,2 mM Трис (2-карбокситетилфосфин гидрохлорид (ТСЕР-НCl) путем нагревания при 80°C в течение 10 мин. Затем каждый образец был дегликозилирован путем добавления PNGase F при соотношении фермента к субстрату 1:5 (мас./мас.) и инкубации при 45°C в течение 25 мин для высвобождения олигосахаридов с последующей дериватизацией высвобожденных гликанов с помощью Rapi Fluor™-MS Reagent (Waters) флуоресцентную метку посредством инкубации при 45°C в течение 25 мин. Производные образцы разводили в конечном растворе, содержащем 25% N,N-диметилформамида и 53% ацетонитрила (об./об.).

Сбор данных проводили с использованием системы Acquity UPLC I-Class (Waters), соединенной с масс-спектрометром Q-Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). 1 мкг высвобожденного и модифицированного гликана загружали в колонку Acquity UPLC Glycan BEH Amide (130°, 1,7 мкм, 2,1 мм ×150 мм) (Waters). Подвижная фаза А представляет собой чистую водную фазу, содержащую 50 mM формиата аммония в воде, pH=4,4. Подвижная фаза Б представляет собой чистую органическую фазу (100% ацетонитрил). Градиент начинался с 25% подвижной фазы А, после чего процентное содержание подвижной фазы А увеличивалось до 32,2%, чтобы элюировать все производные гликанов. Параметры MS были установлены следующим образом: диапазон m/z полного сканирования=650-2000, цель ACG=1e⁶, максимальная IT=100 мс, разрешение =70000, температура источника =350°C, напряжение распыления =4,0 кВ, температура нагревателя вспомогательного газа =250°C, RF-уровень S-линзы =50. Пять наиболее распространенных прекурсоров были выбраны для сканирования MS2 в зависимости от данных, где цель ACG=1e⁵, максимальное IT=250 мс, Stepped NCE =13,20, разрешение =17500.

Состав моносахаридов гликанов определяли на основе экспериментальной массы, измеренной для каждого гликана; структуры гликанов были присвоены на основе совпадения спектров фрагментации MS/MS с теоретическими моделями фрагментации, описанными структурами гликанов в базе данных UniCarbKB.

III. Результаты и обсуждение.

Идентификация и относительное количественное определение гликоформ моноклональных антител.

Расщепление трипсином молекулы IgG4 генерирует пептид, содержащий консервативный сайт N-гликозилирования (EEQF N ST YR (SEQ ID NO: 45), обозначаемый как N297) с переменными гликанами и наряду с ~50 негликозилированными пептидами. Присутствие 1 mM глицина в подвижной фазе (pH=2,0) значительно восстанавливает общие сигналы MS для расщепления IgG4 (mAb1), не влияя на профиль элюирования IP-HILIC, включая ширину пика и время удерживания, как показано на фиг. 42A. УФ-хроматограммы, полученные от подвижных фаз ТФУ с глицином и без него, также идентичны (фиг. 42B). При наблюдении в любом из этих двух условий весь профиль элюции можно разделить на две отдаленные области, содержащие пики негликозилированных пептидов и гликопептидов соответственно. Также отмечено, что различные гликопептиды на колонке HILIC разделяются намного лучше по сравнению с негликозилированными пептидами. Область негликозилированного пептида (1-13 мин) mAb1, например, не проявляет каких-либо расщепленных особенностей в течении первых 11 мин и показывает только ограниченное количество пиков между 10 мин и 13,5 мин (фиг. 42A), в то время как все пики в области гликопептидов (18-25 мин) хорошо расщепляются из-за различий в гидрофильности гликанов.

Аналогичный хроматографический профиль наблюдается для другой молекулы IgG4 (mAb2). Разрешение пика в области гликопептида может быть независимо улучшено за счет удлинения линейного градиента (от 92 до 73% подвижной фазы Б), как показано на фиг. 42C1-42C3.

Восстановленное отношение сигнал-шум в присутствии глицина также обеспечивает качество тандемных масс-спектров (примеры на фиг. 42D и 42E), что позволяет уверенно определять гликопептиды без обращения к другим анализам, таким как анализ высвобожденного гликана. Извлеченные ионные хроматограммы наиболее распространенных 18 гликоформ mAb1 из данных, полученных с помощью оптимизированного градиента, равномерно распределяются в течение 40 мин, как показано на фиг. 42F. Каждый пик EIC, представляющий различный состав гликанов, имеет хорошо описанное время элюирования. Например, дополнительная галактоза (Gal) всегда вызывала 7-минутное увеличение времени элюирования, независимо от ее гликанового состава. Это может быть фукозилированная структура ядра с любым количеством разветвленных N-ацетилглюкозаминов (GlcNAc) или афукозилированная структура ядра. Помимо четкого разделения гликанов с различным составом, для структурных изомеров также наблюдалось базовое разделение из-за того, что Gal был связан через 1,3- или 1,6-связь с разветвленным GlcNAc (например, FA2G1, A2G1). Следует отметить, что профиль элюирования, наблюдаемый для интактных гликопептидов, в значительной степени согласуется с профилем элюирования высвобожденных гликанов, полученным при близком к нейтральному pH с использованием той же колонки HILIC (рис. 42Г), за исключением двух гликанов, содержащих сиаловую кислоту, FA2G2S1 и FA2G1S1, чьи относительное время элюирования незначительно изменяется, скорее всего, из-за протонирования карбоксильных групп в присутствии ТФУ.

В отличие от широкого диапазона времени элюирования в IP-HILIC, пики EIC тех же гликопептидов из набора данных RPLC-MS элюируются только в пределах 1,5-минутного окна, даже несмотря на то, что весь линейный диапазон для градиента составляет 80 мин (рис. 42H1-42H2). Хотя такой недостаток в разделении пиков все еще может быть использован для идентификации гликопептидов из-за высокой скорости сканирования и чувствительности в преобладающих современных масс-спектрометрах, улучшенное разделение всегда дает преимущества с точки зрения уменьшения динамического диапазона со- элюирование пептидов и достижение более точной интеграции пиков. Кроме того, искусственные гликопептиды, образующиеся во время фрагментации в источнике, которые имеют то же время удерживания, что и более крупные гликоформы, из которых они получены, могут быть легко исключены из тех же ранее существовавших гликопептидов с использованием IP-HILIC из-за их разного времени удерживания, в то время как это может быть проблемой для RPLC из-за его неадекватного разделения (фиг. 42H1-42H2).

Уровень усиления S/N глицина может варьироваться для различных пептидных последовательностей или различных молярных соотношений пептида к глицину. Для данной последовательности (EEQFNSTYR; SEQ ID NO: 45) все гликопептиды демонстрируют сходное улучшение отношения сигнал/шум, которое не зависит от состава гликанов и относительного содержания отдельных гликоформ, что подтверждается превосходной линейностью ($R^2=0,998$) построение пиковых зон EIC для отдельных гликоформ mAb1 в двух условиях (фиг. 43A). Постоянство в усилении сигнала приводит к очень сопоставимым процентным уровням для различных гликоформ, определенных количественно в двух условиях, как показано на фиг. 43B и 43C. Этот результат предполагает, что ТФУ в основном подавляет сигнал, образуя ионное соединение между анионом ТФУ и первичным амином, которое можно найти только в аминокислотах, а не в цепях сахара.

Среднее увеличение S/N для гликопептидов в IgG4 составляет приблизительно 19,4 раза, что определено по пересечению графика на фиг. 43A. Гликопептиды из IgG1 также были проанализированы, и наблюдались сходные признаки в отношении хроматографического профиля, а также повышения отношения S/N, независимо от одной аминокислотной замены в пептидной последовательности (EEQYNSTYR; SEQ ID NO: 35). Результаты выведены на фиг. 43D1-43D3 и 43E.

Характеристика сайт-специфического N-гликозилирования профиля белка слитого с Fc-доменом, содержащего несколько сайтов гликозилирования.

Гибридный белок fP1 содержит пять сайтов N-гликозилирования, включая один консервативный сайт гликозилирования Fc (сайт 1), эквивалентный N297 из mAb, и четыре дополнительных сайта (сайты 2-4), расположенные в функциональных доменах. Для IP-HILIC-MS-анализа расщепленных пептидов повышенное отношение сигнал/шум в присутствии глицина имеет решающее значение для улучшенной идентификации гликопептидов, которая зависит от выхода фрагментных ионов в спектрах MS2 (см. фиг. 43F и 43G как пример тандемных масс-спектров). Для систематической оценки того, как добавка глицина улучшает идентификацию сайт-специфических гликопептидов для fP1, результаты поиска по двум условиям были объединены и отфильтрованы с использованием относительно строгих параметров (оценка >150 , $|\text{LogProb}|>2$, $\#\text{PSM}\geq 2$), как показано на фиг. 44A (две верхние панели), демонстрируя, что как количество высокодостоверных PSM, так и идентифицированных гликопептидов улучшаются с добавкой глицина. Наблюдается, что профили гликозилирования различны для каждого сайта, что также подтверждается относительной количественной оценкой с использованием площадей пиков EIC (табл. 5).

Таблица 5

Измерялась зона пика EIC и относительный количественный анализ индивидуальных гликоформ на каждом гликозиде слитого с Fc-доменом белка fP1

Расположение	Название гликана	0,1% ТФУ+1 мМ глицин				0,1% ТФУ				Среднее изменение кратности
		Реплика 1		Реплика 2		Реплика 1		Реплика 2		
		Зона пика	Уровень	Зона пика	Уровень	Зона пика	Уровень	Зона пика	Уровень	
Сайт 1										
	HexNAc	2,1E+06	0,03%	8,5E+05	0,01%	1,6E+05	0,03%	1,5E+05	0,03%	9,8
	HexNAc(1)dHex(1)	7,1E+06	0,11%	5,6E+06	0,08%	3,0E+05	0,05%	2,6E+05	0,05%	22,5
	HexNAc(2)Hex(3)	1,1E+07	0,16%	9,9E+06	0,14%	7,2E+05	0,13%	6,7E+05	0,12%	14,8
	A1	9,5E+06	0,14%	1,0E+07	0,15%	7,1E+05	0,13%	6,5E+05	0,12%	14,6
	A1G1	1,6E+07	0,23%	1,8E+07	0,25%	1,4E+06	0,25%	1,5E+06	0,29%	11,2
	A2	5,2E+08	7,75%	5,1E+08	7,37%	4,6E+07	8,18%	4,4E+07	8,09%	11,5
	A2G1	3,1E+08	4,63%	3,1E+08	4,50%	3,4E+07	6,05%	3,4E+07	6,25%	9,2
	A2G2	6,2E+07	0,92%	6,2E+07	0,90%	5,2E+06	0,93%	4,7E+06	0,88%	12,5
	FA1	1,3E+07	0,19%	1,1E+07	0,16%	1,2E+06	0,22%	9,6E+05	0,18%	11,1
	FA1G1S1	6,6E+06	0,10%	6,9E+06	0,10%	6,0E+05	0,11%	5,8E+05	0,11%	11,4
	FA2	1,9E+09	28,13%	1,9E+09	28,07%	1,6E+08	28,76%	1,6E+08	29,53%	12,0
	FA2G1	2,9E+09	42,99%	3,0E+09	43,70%	2,5E+08	44,67%	2,3E+08	43,29%	12,2
	FA2G2	8,4E+08	12,44%	8,4E+08	12,13%	5,2E+07	9,32%	5,3E+07	9,80%	16,0
	FA2G2_Man4	3,0E+06	0,04%	2,6E+06	0,04%	2,4E+05	0,04%	2,5E+05	0,05%	11,5
	FA2G2S1	3,1E+07	0,47%	2,7E+07	0,39%	2,1E+06	0,38%	2,1E+06	0,38%	13,9
	Man5	1,2E+07	0,18%	1,5E+07	0,21%	1,8E+06	0,32%	1,7E+06	0,32%	7,7
	Man8	3,2E+05	0,05%	2,8E+05	0,04%	3,1E+05	0,05%	2,9E+05	0,05%	10,1

047025

	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	06		06		05		05		
Сайт 2									
HexNAc(2)	7,3E	0,53	6,7	0,47	1,7	0,25	1,5	0,24	
Hex(3)	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	43,7
	07		07		06		06		
A1	6,6E	0,48	6,6	0,46	1,6	0,24	1,6	0,24	41,4
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		06		06		
A1G1	1,8E	1,26	1,7	1,20	4,4	0,66	4,2	0,65	40,3
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		06		06		
A1G1S1	2,7E	1,92	2,8	1,98	1,0	1,56	1,0	1,60	26,5
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
A2	7,5E	0,54	7,3	0,51	2,0	0,30	1,9	0,30	37,7
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		06		06		
A2G1	8,2E	5,93	8,1	5,67	2,7	3,98	2,5	3,96	31,3
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
A2G1S1	3,9E	2,81	4,0	2,84	2,9	4,30	2,7	4,28	14,1
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
A2G2	2,2E	15,80	2,2	15,57	1,2	18,19	1,2	18,24	18,5
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	09		09		08		08		
A2G2S1	4,4E	31,90	4,7	33,13	2,5	36,78	2,3	36,55	19,0
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	09		09		08		08		
A2G2S2	1,8E	12,72	1,8	12,52	9,6	14,43	9,3	14,47	18,7
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	09		09		07		07		
A3G1/A2B G1	1,4E	0,10	1,4	0,10	4,3	0,06	3,8	0,06	35,7
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		05		05		
A3G2/A2B G2	4,6E	0,33	4,8	0,34	1,5	0,23	1,3	0,21	32,6
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		06		06		
A3G3	5,1E	0,37	5,1	0,36	1,4	0,21	1,5	0,23	35,1
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		06		06		
FA2G1	5,9E	0,42	6,1	0,43	2,0	0,30	2,1	0,33	29,4
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		06		06		
FA2G2	3,0E	2,15	3,0	2,09	1,1	1,58	1,1	1,64	28,2
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
FA2G2S1	7,1E	5,13	7,5	5,29	2,6	3,92	2,4	3,78	29,0
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
FA2G2S2	1,9E	1,37	1,9	1,32	7,2	1,08	7,1	1,11	26,4

047025

	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		06		06		
Man4_A1G	1,7E	1,26	1,9	1,31	5,9	0,88	6,1	0,95	30,1
1	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		06		06		
Man5_A1G	1,9E	1,37	2,0	1,38	8,1	1,22	7,9	1,24	24,0
1	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		06		06		
Man5_A1G	3,5E	2,53	3,5	2,44	1,2	1,82	1,2	1,90	28,7
1S1	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
Man4_A1G	3,4E	2,47	3,5	2,49	1,6	2,33	1,5	2,41	22,5
1S1	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
Man4	4,1E	0,29	4,1	0,29	1,1	0,16	1,0	0,16	39,0
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		06		06		
Man5	1,1E	8,02	1,1	7,52	3,5	5,31	3,4	5,24	31,6
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	09		09		07		07		
Man6+фос	1,8E	0,13	2,0	0,14	9,8	0,15	9,6	0,15	19,6
фap	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		05		05		

Caйp 3

HexNAc(2)	4,8E	0,35	1,2	0,09	2,4	0,24	2,2	0,22	13,1
Hex(3)	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		06		06		
A1	2,2E	0,16	1,3	0,10	1,2	0,12	1,1	0,11	15,1
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		06		06		
A1G1S1	7,0E	5,09	6,7	4,84	3,7	3,59	3,5	3,55	18,9
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
A2	8,9E	0,07	9,2	0,07	4,6	0,04	4,3	0,04	20,2
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	06		06		05		05		
A2G1	1,6E	1,14	1,5	1,10	7,5	0,73	7,2	0,73	20,9
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		06		06		
A2G1S1	1,6E	1,16	1,5	1,07	9,8	0,96	9,5	0,96	15,9
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		06		06		
A2G2	2,4E	17,52	2,3	16,85	1,5	14,45	1,4	14,36	16,2
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	09		09		08		08		
A2G2S1	3,0E	21,88	3,1	22,45	3,4	33,54	3,3	33,59	9,0
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	09		09		08		08		
A2G2S2	4,5E	3,28	4,7	3,38	4,5	4,36	4,5	4,57	10,2
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
A3G1/A2B	2,3E	0,17	2,2	0,16	1,1	0,11	9,9	0,10	21,4

047025

G1	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		06		05		
	3,2E		3,4		2,2		2,0		
A3G3	+	0,02	E+	0,02	E+	0,02	E+	0,02	15,8
	06	%	06	%	05	%	05	%	
	2,1E		2,1		9,5		9,1		
FA1G1	+	0,15	E+	0,15	E+	0,09	E+	0,09	22,5
	07	%	07	%	05	%	05	%	
FA1G1_Man4	+	0,28	E+	0,28	E+	0,21	E+	0,20	18,7
	07	%	07	%	06	%	06	%	
	4,5E		4,1		2,5		2,4		
FA1G1S1	+	0,33	E+	0,30	E+	0,24	E+	0,24	17,6
	07	%	07	%	06	%	06	%	
FA1G1S1_Man4	+	0,36	E+	0,36	E+	0,57	E+	0,55	8,6
	07	%	07	%	06	%	06	%	
	2,8E		2,8		1,2		1,1		
FA2G1	+	0,21	E+	0,20	E+	0,12	E+	0,11	24,2
	07	%	07	%	06	%	06	%	
	2,7E		3,0		1,6		1,6		
FA2G2	+	2,01	E+	2,18	E+	1,59	E+	1,64	17,7
	08	%	08	%	07	%	07	%	
	6,6E		7,0		4,9		4,8		
FA2G2S1	+	4,82	E+	5,07	E+	4,74	E+	4,84	14,0
	08	%	08	%	07	%	07	%	
	8,4E		8,9		5,8		5,5		
FA2G2S2	+	0,61	E+	0,64	E+	0,56	E+	0,56	15,3
	07	%	07	%	06	%	06	%	
	1,8E		1,8		5,2		5,0		
FA3G1	+	0,01	E+	0,01	E+	0,01	E+	0,01	35,3
	06	%	06	%	04	%	04	%	
Man4	+	0,18	E+	0,17	E+	0,14	E+	0,14	17,5
	07	%	07	%	06	%	06	%	
	2,0E		2,0		1,1		1,0		
Man5	+	14,93	E+	14,88	E+	10,72	E+	10,46	19,2
	09	%	09	%	08	%	08	%	
	9,2E		1,1		7,6		6,9		
Man7	+	0,07	E+	0,08	E+	0,07	E+	0,07	13,8
	06	%	07	%	05	%	05	%	
Man4_A1G1	+	5,23	E+	5,02	E+	3,61	E+	3,48	19,7
	08	%	08	%	07	%	07	%	
Man4_A1G1S1	+	9,05	E+	9,16	E+	8,77	E+	8,66	14,2
	09	%	09	%	07	%	07	%	
	5,8E		6,2		3,5		3,6		
Man5_A1G1	+	4,22	E+	4,49	E+	3,42	E+	3,60	16,9
	08	%	08	%	07	%	07	%	
Man5_A1G1S1	+	6,58	E+	6,73	E+	6,84	E+	6,93	13,2
	09	%	09	%	07	%	07	%	

047025

	Манб+фос фат	08 1,7E + 07	0,12 %	08 1,7 E+ 07	0,13 %	07 1,4 E+ 06	0,14 %	07 1,3 E+ 06	0,14 %	12,3
Сайт 4										
	A2G2	1,2E + 07	0,29 %	1,1 E+ 07	0,28 %	7,9 E+ 05	0,15 %	7,3 E+ 05	0,14 %	15,1
	A2G2S1	4,1E + 07	1,03 %	4,2 E+ 07	1,03 %	3,7 E+ 06	0,69 %	3,6 E+ 06	0,71 %	11,3
	FA1	8,3E + 06	0,21 %	8,4 E+ 06	0,21 %	3,8 E+ 05	0,07 %	3,4 E+ 05	0,07 %	23,4
	FA1G1	2,2E + 07	0,55 %	2,2 E+ 07	0,55 %	1,1 E+ 06	0,21 %	1,0 E+ 06	0,20 %	20,9
	FA1G1S1	3,8E + 07	0,96 %	4,0 E+ 07	0,99 %	4,0 E+ 06	0,76 %	4,0 E+ 06	0,78 %	9,8
	FA2G1	2,6E + 07	0,66 %	2,5 E+ 07	0,62 %	2,0 E+ 06	0,38 %	1,9 E+ 06	0,38 %	13,1
	FA2G2	8,4E + 08	21,14 %	8,2 E+ 08	20,44 %	6,9 E+ 07	13,01 %	6,6 E+ 07	12,91 %	12,3
	FA2G2S1	2,0E + 09	50,26 %	2,0 E+ 09	50,51 %	3,0 E+ 08	57,18 %	2,9 E+ 08	56,42 %	6,8
	FA2G2S2	6,7E + 08	16,92 %	7,0 E+ 08	17,47 %	1,1 E+ 08	21,09 %	1,1 E+ 08	21,98 %	6,1
	FA2FG2S1	3,1E + 07	0,77 %	3,1 E+ 07	0,77 %	3,3 E+ 06	0,62 %	3,4 E+ 06	0,66 %	9,3
	FA2FG2S2	1,8E + 07	0,45 %	1,8 E+ 07	0,45 %	1,7 E+ 06	0,32 %	1,7 E+ 06	0,34 %	10,6
	FA3G3S1	1,6E + 08	4,02 %	1,6 E+ 08	3,95 %	1,2 E+ 07	2,24 %	1,2 E+ 07	2,32 %	13,5
	FA3G3S2	7,3E + 07	1,82 %	7,3 E+ 07	1,80 %	8,2 E+ 06	1,55 %	7,5 E+ 06	1,47 %	9,2
	FA3G3S3	1,3E + 07	0,32 %	1,3 E+ 07	0,33 %	1,5 E+ 06	0,28 %	1,6 E+ 06	0,32 %	8,4
	Манб+фос фат	2,2E + 07	0,56 %	2,4 E+ 07	0,59 %	7,7 E+ 06	1,45 %	6,7 E+ 06	1,32 %	3,2
Сайт 5										
	FA1	7,4E	0,54	7,5	0,55	3,7	0,53	3,4	0,52	2,1

	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	06		06		06		06		
FA1G1	2,9E	2,13	2,8	2,08	1,4	2,03	1,3	1,91	2,2
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		07		07		
FA1G1S1	3,7E	2,70	3,6	2,64	1,8	2,61	1,6	2,50	2,1
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		07		07		
FA2G1	3,3E	0,24	3,4	0,25	1,1	0,15	1,0	0,16	3,2
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	06		06		06		06		
FA2G2	1,2E	8,87	1,2	8,83	4,2	6,11	4,2	6,37	2,9
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		07		07		
FA2G2S1	4,9E	35,51	4,8	35,21	2,4	34,75	2,2	34,11	2,1
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		08		08		
FA2G2S2	4,5E	32,55	4,5	32,80	2,6	37,71	2,5	37,65	1,8
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	08		08		08		08		
FA2FG2S1	1,1E	0,79	7,4	0,55	6,1	0,88	6,4	0,97	1,5
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		06		06		06		
FA2FG2S2	9,0E	0,66	8,2	0,60	4,2	0,60	5,0	0,76	1,9
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	06		06		06		06		
FA3G3S1	4,7E	3,46	5,1	3,78	1,8	2,63	1,9	2,83	2,7
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		07		07		
FA3G3S2	5,8E	4,23	6,0	4,41	2,2	3,21	2,1	3,25	2,7
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		07		07		
FA3G3S3	2,5E	1,79	2,3	1,68	1,0	1,50	1,1	1,66	2,2
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		07		07		
FA4G4S2	6,8E	0,50	6,0	0,44	3,6	0,52	3,6	0,54	1,8
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	06		06		06		06		
Man6+фос фат	8,3E	6,05	8,4	6,18	4,7	6,77	4,5	6,79	1,8
	+	%	E+	%	E+	%	E+	%	
	07		07		07		07		

Как и в случае с mAb, усиление сигнала высокостабильно для всех гликоформ из одного и того же сайта гликозилирования (фиг. 44C), что приводит к сравнимым относительным процентным содержаниям отдельных гликоформ, определенных количественно с добавкой глицина и без нее (табл. 5). Также заметно, что усиление сигнала варьируется для гликопептидов, содержащих разные гликозиты, от 2-кратного (в сайте 5) до 50-кратного (в сайте 2). Это указывает на то, что уровень подавления сигнала на основе ТФУ или ослабления ТФУ на основе глицина значительно различается для разных пептидных последовательностей.

Помимо адекватного соотношения сигнал-шум, достаточное разделение LC также целесообразно для идентификации сайт-специфического гликозилирования в высокогликозилированном белке. Все пики гликопептидов можно хорошо отличить от негликозилированных пептидов с помощью разделения IP-HILIC, выявленного по пику EIC сигнатурного иона(ов) оксония в спектрах MS2 от гликопептидов (фиг. 44D). Чтобы изучить, как эти гликопептиды отделяются друг от друга, пики EIC четырех репрезентативных гликоформ (FA2G1, FA2G2, FA2G2S1 и FA2G2S2) извлекают для всех семи гликозитосодержащих пептидов в виде семи "конвертов" пиков, показанных на фиг. 45A. Профиль элюирования в пределах одной оболочки в значительной степени сравним с профилем в других оболочках, включая порядок элюирования гликоформ и разницу во времени удерживания между каждым пиком. И разница во времени удерживания между двумя оболочками гликопептидов коррелирует только с аминокислотной последовательностью, которая, вероятно, связана с частотой полярных остатков, как предполагается в нескольких моделях для предсказания удерживания пептидов в HILIC. Описательно, последовательность пептида в сайте 4 (XXXXXXXXXX, SEQ ID NO: 36) содержит пять полярных остатков из 10 общих аминокислот, что дает 50%-ную частоту встречаемости. Последовательность другого пептида, покрывающая тот же гликозит, но содержащая дополнительный остаток лизина на N-конце (обозначенный как Сайт 4^b), имеет несколько более высокий процент полярных остатков (54,4%), поэтому оболочка гликопептидов в Сайте 4^b элюируется позже, чем Сайт 4^a. А время элюирования Сайта 4^b идентично оболочке гликопептида Сайта 5, поскольку оба этих пептида содержат 54,4% полярных

остатков, несмотря на различное сочетание аминокислот. Оболочка в Сайте 3, содержащая только 50% полярных остатков, элюируется позже, чем две последние оболочки, возможно, из-за присутствия С-концевого аргинина (вместо лизина) в пептидной последовательности, где гуанидиногруппа может иметь больший вклад в общую полярность. Та же тенденция наблюдается и для всех трех других оболочек, пептидные последовательности которых содержат С-концевой аргинин и имеют высокую частоту полярных остатков. Гликопептиды домена Fc (Сайт 1) элюируются в конце из-за чрезвычайно высокой гидрофильности, определяемой пептидной последовательностью, состоящей из всех полярных остатков. Хотя две кислые аминокислоты (Glu) в этом пептиде остаются в форме нейтрализованной карбоновой кислоты, они все еще могут прочно связываться с нейтральной амидной группой неподвижной фазы. Таким образом, гликопептиды можно разделить как по структуре гликана, так и по аминокислотной последовательности; а пространство между двумя пиками гликоформ одного гликозита заполнено пиками других гликозитов. Следовательно, большинство гликопептидов в fP1 могут быть равномерно распределены в широком диапазоне времени элюирования, что позволяет эффективно выбирать предшественники для сканирования MS2 во время сбора данных в зависимости от данных.

Такие особенности, наблюдаемые при разделении IP-HILIC с использованием ТФУ, могут не воспроизводиться при использовании более слабой кислоты без сильного свойства связывания ионов, такой как муравьиная кислота. Во-первых, разделение на основе HILIC/FA может привести к неполному отделению негликозилированных пептидов от гликопептидов; и те же выделенные репрезентативные пики показали другие субпопуляции с ранним элюированием, что указывает на гетерогенную гидрофильность различных гликопептидов из-за отсутствия реагента, разделяющего ион (фиг. 44D). По сравнению с разделением HILIC/TFA этот недостаток LC характеристик HILIC/FA приводит к меньшему выявлению гликопептидов, как показано на третьей панели фигуры 44A и на графике Вена на фиг. 44B, хотя добавление глицина все же может обеспечить около 5-кратное увеличение усиления сигнала в среднем, и идентифицированные гликопептиды имеют большее количество PSM по сравнению с набором данных ТФУ. Характеристики HILIC в подвижных фазах, содержащих FA, могут быть получены с использованием других стационарных материалов HILIC, которые могут дополнительно улучшить идентификацию гликопептидов при комбинировании HILIC/FA с добавками глицина. RPLC/TFA с использованием колонки C18 обладает ортогональной разрешающей способностью для разделения гликопептидов из нескольких участков. Гликопептиды из нескольких сайтов хорошо отделены друг от друга в виде разных кластеров (фиг. 36D). Хотя они не полностью изолированы от других негликозилированных пептидов, редко встречаются негликозилированные пептиды в этом единственном гликопротеине fP1, которые элюируются в этих кластерах гликопептидов, поэтому идентификация гликопептидов с помощью RPLC-MS остается сравнимой с способом IP-HILIC-MS (фиг. 44A, последние две панели и фиг. 44B).

Обнаружение низкообильного O-гликозилирования и неканонического N-гликозилирования в моноклональном антителе с использованием IP-HILIC-MS.

Поскольку IP-HILIC демонстрирует способность характеризовать гликопептиды из нескольких гликозитов в fP1, он также должен иметь возможность идентифицировать гликопептиды из неканонического гликозита для mAb. Количество вводимого образца было немного увеличено, чтобы улучшить возможность обнаружения гликопептидов с низким содержанием, таким образом получая высокое качество тандемных масс-спектров. При изучении mAb3 на ранней стадии разработки лекарств уверенно идентифицировано несколько гликопептидов с низким содержанием с различными аминокислотными последовательностями, включая гликопептиды, содержащие N297 с неполным расщеплением (такие как TKPREEQFNSTYR; SEQ ID NO: 44), а также гликопептиды, содержащие неканонические гликозиты N91, расположенные в домене VL, и N163, расположенные в домене CH1 (см. пример тандемных масс-спектров на фиг. 45B и 45C). В отличие от канонического сайта Fc N297, который преимущественно занят гликанами с фукозилированной структурой биантеннарного комплекса, три гликана с высоким содержанием маннозы идентифицированы в легкой цепи N91 и только один гликан FA2G2 идентифицирован в тяжелой цепи N163, и оба сайта обладают гликановой оккупацией как 0,4% и 0,07% соответственно. Хотя большое количество введенного образца может дать возможность идентификации этих гликопептидов с низким содержанием, может иметь место недооценка содержания агликозилированных пептидов из-за их насыщения сигнала. Меньшее количество вводимого образца количественно определяет более низкие (и, возможно, более точные) уровни заполнения для каждого отдельного гликана (рис. 45D). В другом исследовании O-связанный гликан муцинового типа HexNAc(1)Hex(1)NeuAc(2) с низким содержанием идентифицирован в домене VH в одном плече для биспецифического антитела, mAb4, при поиске против наиболее часто встречающегося у млекопитающих O-связанных гликанов база данных (см. пример тандемных масс-спектров на фигурах 45E и 45F), хотя уровень этого O-связанного гликопептида количественно оценивается как менее 0,05%. Существование этих редких гликанов в Fab-области также подтверждается на уровне интактного белка с использованием сильной катионообменной хроматографии в сочетании с нативной масс-спектрометрией, и никаких других гликанов в Fab-области обнаружено не было.

Хотя эти редкие гликаны не могут быть обнаружены независимо с помощью RPLC-MS, все еще

недостаточно случаев для статистической демонстрации преимущества использования IP-HILIC-MS для идентификации неканонических малораспространенных N-гликанов или O-гликанов. Вместо этого исследование гликопептидов с низким содержанием может дать перспективу в отношении воздействия потенциального вмешательства. Обнаружение чрезвычайно малораспространенных (глико)пептидов обычно является сложной задачей в присутствии очень распространенных помех при совместном элюировании, особенно для сбора данных, основанного на данных, в масс-спектрометре типа Orbitrap, потому что С-ловушка может быть быстро заполнена ионами с высокой концентрацией и ионы с низкой концентрацией могут не накапливаться в достаточной степени за более короткое время впрыска и могут не давать сверхпороговые сигналы для запуска тандемной MS2 для идентификации. Несмотря на то, что и HILIC, и RPLC не могут полностью устранить сигналы помех, основной источник помех и уровень воздействия могут быть разными. Для RPLC-MS негликозилированные пептиды широко распределяются по всему градиенту и потенциально могут быть причиной помех для любых гликопептидов с низким содержанием (фиг. 46A), в то время как для IP-HILIC-MS предположительно нет помех от негликозилированных пептидов, вся популяция которых была сжата до раннего времени элюирования из-за образования ионных пар с ТФУ, и единственным источником интерференции являются широко распространенные канонические гликопептиды Fc (фиг. 46B). Предполагается, что эта интерференция гликопептидов Fc должна иметь меньший негативный эффект по сравнению с негликозилированной интерференцией в RPLC-MS для идентификации гликопептидов с низким содержанием, потому что (1) количество гликопептидов Fc намного меньше, чем количество негликозилированных пептидов и (2) интенсивность гликопептидов Fc обычно самая низкая среди всех пептидов, расщепленных из mAb. Фактически, только две или три основные гликоформы, такие как FA2, FA2G1 и FA2G2 в mAb3 (относительное содержание >10%), могут быть идентифицированы как истинные помехи, но остальные гликоформы Fc вызывают минимальную озабоченность из-за их более низкого содержания.

Как показано на фиг. 46C, вне репрезентативного 6-минутного окна (67-73 мин) в RPLC всего 2,7 мин имеют сигналы MS от пептидов с высоким содержанием (67,5-68 мин, 69-70 мин, 70,4-70,6 мин и 71-72 мин), создавая высокий риск совместного элюирования с любыми гликопептидами с низким содержанием. Наблюдается, что весь кластер из трех гликоформ с высоким содержанием маннозы на HC N91 элюируется совместно с 250-кратным интенсивным пиком (69,0-69,4 мин). Такая ситуация может произойти где угодно на всей 80-минутной хроматограмме. В IP-HILIC, хотя два гликопептида (Man6 и Man7) из N91 частично элюируются совместно с гликопептидами Fc, интенсивность интерференции гликопептидов Fc составляет только 50-кратную и 8-кратную соответственно. Из всей 10-минутной области элюирования гликопептида (12-22 минуты) только одна минута (сумма ширины пика для трех основных гликоформ) имеет сильные интерференционные пики, что означает, что 90% области могут не иметь серьезной интерференции для гликопептиды с низким содержанием, включая область "долины" (12,5-16,5 мин на фиг. 46B), где наблюдаются только фоновый шум и другие гликопептиды с низким содержанием.

Подобным образом, O-связанный гликопептид на домене VH mAb4 также элюируется в той же области в IP-HILIC-MS, в отличие от пика EIC, который не удается извлечь из набора данных RPLC-MS, вероятно, из-за увеличения числа не-гликозилированных пептидов для биспецифических mAb (фиг. 46E). Поскольку O-гликан обычно содержит меньше моносахаридных звеньев по сравнению с N-гликаном, O-гликопептиды менее гидрофильны и, вероятно, элюируются раньше, чем N-гликопептиды. Предполагается, что любые другие O-гликопептиды из mAb также элюируются в области "долины" с минимальными интерференционными сигналами либо от негликозилированных пептидов, либо от Fc-гликозилированных пептидов.

Этот сниженный уровень интерференции делает IP-HILIC-MS уникальным подходом для идентификации гликопептидов с низкой распространенностью, что также подчеркивает незаменимую роль TFA в качестве реагента, разделяющего ион, а также глицина в качестве реагента, усиливающего сигнал в этом приложении. Данный подход можно использовать в качестве подхода для быстрого скрининга редкого гликозилирования на ранней стадии биофармацевтических открытий, не требуя второго измерения обогащения гликопептидов. Производительность может быть дополнительно оптимизирована с помощью удлиненного градиента. Кроме того, поскольку большинство непредсказуемых молекулярно-зависимых критических атрибутов качества (CQA) могут быть расположены в Fab-домене, а не в Fc-домене, основное внимание было уделено изолированному Fab-участку путем полного удаления Fc-домена, а также Fc-домена интерференция N-гликопептидов, дополнительно улучшающая чувствительность обнаружения.

В этом исследовании было продемонстрировано, что глицин можно добавлять в содержащие ТФУ подвижные фазы, чтобы значительно решить проблему дефицита чувствительности в IP-HILIC-MS на основе ТФУ без неблагоприятного влияния на характеристики ЖХ при разделении пептидов. Данный способ основан на насосе с регулярным потоком и демонстрирует превосходную стабильность и надежность, позволяя определять профили гликозилирования для множества различных типов биотерапевтических препаратов и гликозилированных функциональных белков. Для mAbs IP-HILIC-MS создает несмещенный профиль гликанов на уровне интактных гликопептидов по сравнению с анализом

высвобожденных гликанов, предполагая, что этот подход может стать дополнением или заменой анализа высвобожденных гликанов в стандартной характеристике белков. Кроме того, IP-HILIC-MS может быть совместим с способом MRM или на основе PRM для количественного определения гликопептидов, в котором необходимо одновременно планировать относительно небольшое количество предшественников из-за широкого диапазона времени элюирования гликопептидов. Эти целевые или нецелевые способы IP-HILIC-MS можно плавно внедрить в рабочий процесс многоатрибутного мониторинга или высокопроизводительную аналитическую платформу, которая обещает развитие аналитической науки для биофармацевтической промышленности.

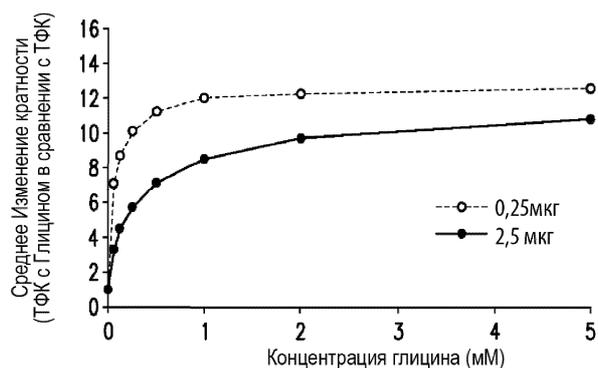
Добавку глицина можно использовать в RPLC-MS или HILIC-MS со слабым связыванием ионов для усиления сигнала MS и увеличения общей идентификации сайт-специфического гликозилирования. Опубликованные результаты по слитому белку с Fc-доменом демонстрируют, что способ IP-HILIC-MS может сильно конкурировать с способом RPLC-MS (с той же интенсивностью сигнала) в отношении картирования профилей гликозилирования из нескольких сайтов гликозилирования. Благодаря высокой скорости сканирования и широкому динамическому диапазону современных масс-спектрометров интерференция негликозилированных пептидов может хорошо переноситься в RPLC-MS. Однако для мало замещенных гликозитов, таких как неканонические сайты в mAb, IP-HILIC по-прежнему демонстрирует преимущество в улучшении их обнаруживаемости, даже если не используются дополнительные этапы обогащения. Также разумно предположить, что IP-HILIC-MS будет работать намного лучше, чем RPLC-MS, при применении к образцам, которые сильно содержат фоновый негликозилированный пептид; и линейный градиент может быть выборочно удлинен в области элюирования гликопептида в IP-HILIC для эффективного увеличения разделения гликопептида, что вряд ли может быть реализовано в RPLC-MS. Следовательно, целевой или нецелевой способ быстрого и простого скрининга гликоформ в масштабе гликопротеома, например, в сыворотке крови человека, может быть реализован с помощью платформы IP-HILIC-MS (UPLC). Помимо нейтрального материала стационарной фазы HILIC, о котором сообщается в этом исследовании (амид), можно оценить другие заряженные стационарные фазы, такие как цвиттер-ионные материалы.

Данное изобретение не предполагает ограничение объема конкретными вариантами реализации, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации данного изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе будут выявлены специалистами в данной области техники из предшествующего описания и прилагаемых фигур. Такие модификации предусмотрены для включения в объем прилагаемой формулы изобретения.

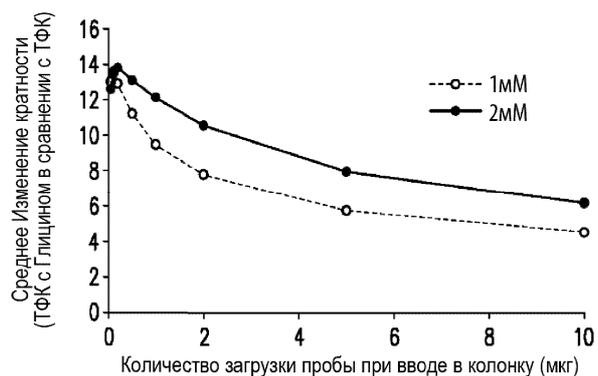
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ усиления масс-спектрального сигнала, включающий:
 - приведение образца в контакт с разделительной колонкой в условиях, позволяющих компонентам образца связываться с субстратом, где образец содержит пептид;
 - применение первого градиента подвижной фазы к разделительной колонке, при этом первый градиент подвижной фазы включает трифторуксусную кислоту (TFA) и низкомолекулярную добавку или муравьиную кислоту (FA) и низкомолекулярную добавку, где низкомолекулярная добавка в первой подвижной фазе выбрана из глицина, аланина, серина, валина, N-ацетилглицина, метионина, β-аланина, аспарагиновой кислоты или N-метилглицина;
 - применение второго градиента подвижной фазы в разделительной колонке, где второй градиент подвижной фазы включает TFA в ацетонитриле (ACN) и низкомолекулярную добавку или FA в ACN и низкомолекулярную добавку, где низкомолекулярная добавка во второй подвижной фазе выбрана из глицина, аланина, серина, валина, N-ацетилглицина, метионина, β-аланина, аспарагиновой кислоты или N-метилглицина; и
 - проведение масс-спектрометрического анализа элюированных компонентов образца.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что низкомолекулярная добавка в первой подвижной фазе выбрана из глицина, аланина, серина или валина.
3. Способ по п.2, отличающийся тем, что низкомолекулярная добавка в первой подвижной фазе представляет собой глицин.
4. Способ по п.2 или 3, отличающийся тем, что концентрация низкомолекулярных добавок составляет от около 1 мМ до около 2 мМ.
5. Способ по п.3, отличающийся тем, что концентрация глицина составляет около 1 мМ.
6. Способ по п.3, отличающийся тем, что концентрация глицина составляет около 2 мМ.
7. Способ по п.1, отличающийся тем, что низкомолекулярная добавка во второй подвижной фазе выбрана из глицина, аланина, серина или валина.
8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что низкомолекулярная добавка во второй подвижной фазе представляет собой глицин.
9. Способ по п.7 или 8, отличающийся тем, что концентрация низкомолекулярных добавок составляет от около 1 мМ до около 2 мМ.

10. Способ по п.8, отличающийся тем, что концентрация глицина составляет около 1 мМ.
11. Способ по п.8, отличающийся тем, что концентрация глицина составляет около 2 мМ.
12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что концентрация TFA в первой подвижной фазе составляет от около 0,05% до 0,1% TFA в H₂O, или концентрация FA в первой подвижной фазе составляет около 0,1% FA.
13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что концентрация TFA во второй подвижной фазе составляет около 0,05% TFA в 80% ACN и 20% H₂O или около 0,1% TFA в 80% ACN и 20% H₂O.
14. Способ по п.1, отличающийся тем, что пептид представляет собой гликопептид.
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что гликопептид получают из моноклонального антитела.
16. Способ по п.15, отличающийся тем, что моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.
17. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что дополнительно включает подготовку образца перед контактированием образца с разделительной колонкой в условиях, которые позволяют компонентам образца связываться с субстратом.
18. Способ по п.17, отличающийся тем, что подготовка образца включает:
 - приведение образца в контакт с денатурирующим и восстанавливающим раствором в условиях, допускающих денатурацию и восстановление образца;
 - приведение в контакт денатурированного и восстановленного образца с алкилирующим раствором в условиях, допускающих алкилирование образца;
 - приведение в контакт алкилированного образца с раствором гидролизата в условиях, позволяющих гидролизовать образец; а также
 - контакт расщепленного образца с гасящим раствором в условиях, которые останавливают расщепление образца.
19. Способ по п.18, отличающийся тем, что образец представляет собой моноклональное антитело, а раствор гидролизата содержит протеазу.
20. Способ по п.19, отличающийся тем, что протеаза содержит трипсин.
21. Способ по любому из пп.1-20, отличающийся тем, что разделительная колонка представляет собой колонку для жидкостной хроматографии.
22. Способ по п.21, отличающийся тем, что разделительная колонка для жидкостной хроматографии (LC) содержит колонку для жидкостной хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC).
23. Способ по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что проведение масс-спектрометрического анализа элюированных компонентов образца включает применение ионизации электрораспылением для генерирования заряженных ионов из элюированных компонентов образца и измерение образовавшихся заряженных ионов.
24. Способ по любому из пп.1-23, отличающийся тем, что способ усиливает масс-спектральный сигнал, как указано, в около 5-14 раз в среднем и/или приблизительно около 2-1000 раз ($z \geq 3$) для частиц с высоким зарядом.
25. Способ по п.24, отличающийся тем, что спектральный сигнал увеличивается приблизительно в 14 раз и/или приблизительно в 1000 раз для частиц с высоким зарядом.
26. Способ по любому из пп.14-16, отличающийся тем, что сигнал масс-спектра, полученный на элюированных компонентах образца, усиливается от 2 до 50 раз по сравнению с сигналом масс-спектра, полученным на контрольном образце в отсутствие малой молекулярной добавки.
27. Способ по п.26, отличающийся тем, что гликопептид представляет собой гликопептид, содержащий O-гликан.
28. Способ по п.26, отличающийся тем, что гликопептид представляет собой гликопептид, содержащий N-гликан.
29. Способ по п.27 или 28, отличающийся тем, что O-гликан или N-гликан связан с маркером.
30. Способ по п.29, отличающийся тем, что маркером выступает прокаинамид.
31. Способ по любому из пп.26-30, отличающийся тем, что низкомолекулярная добавка представляет собой глицин.



Фиг. 1А



Фиг. 1В

Последовательность ID номер: 1

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTAGMSVGWIRQPPGKALEWLADIWDDKKHYNPSLKDRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDP
 ADTATYYCARDMIFNFYFDMVGGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
 CLYLSVSVTVPSSSLGTQTYICNMNHKPSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPCPAPELLCGPSVFLFPPKPKDLMISRTPQVTCVVDVSHS
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

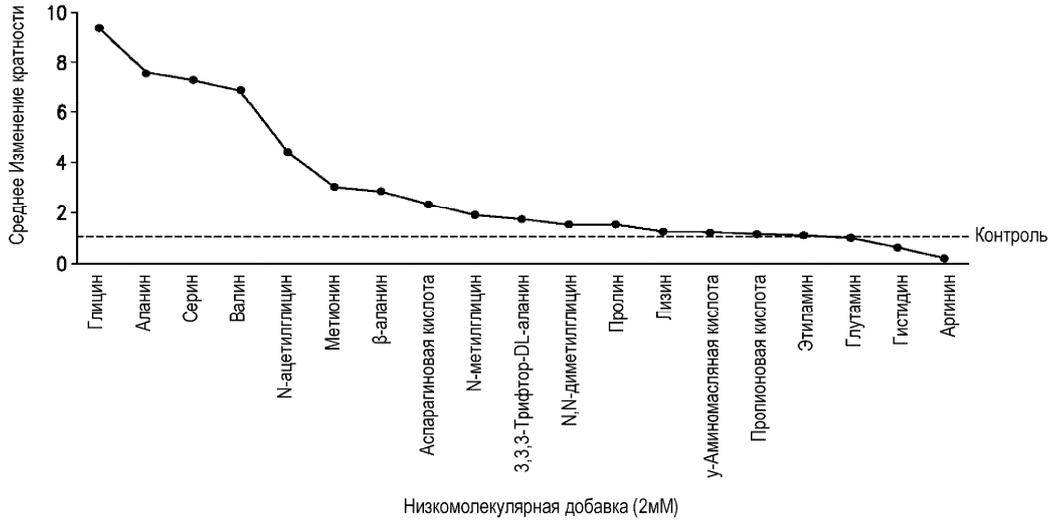
Последовательность ID номер: 2

DIQMTQSPSTLSASVGRVITITCSASSRVGYMHWYQQKPKGKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSLPQDDFATYYCFQGS
 YPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKAD
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

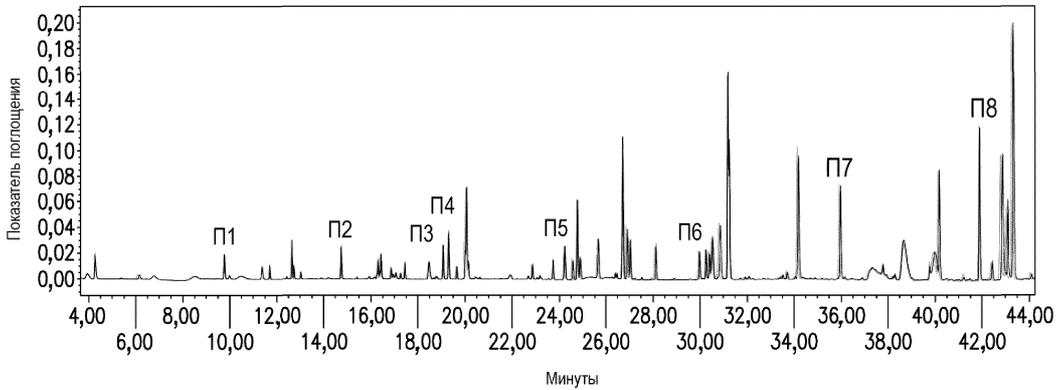
Фиг. 1С



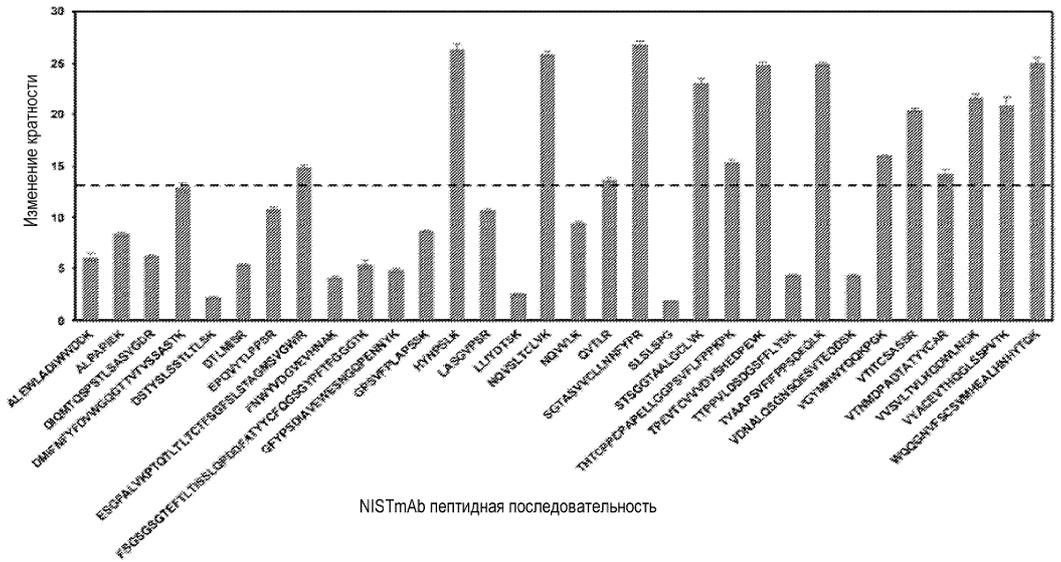
Фиг. 2



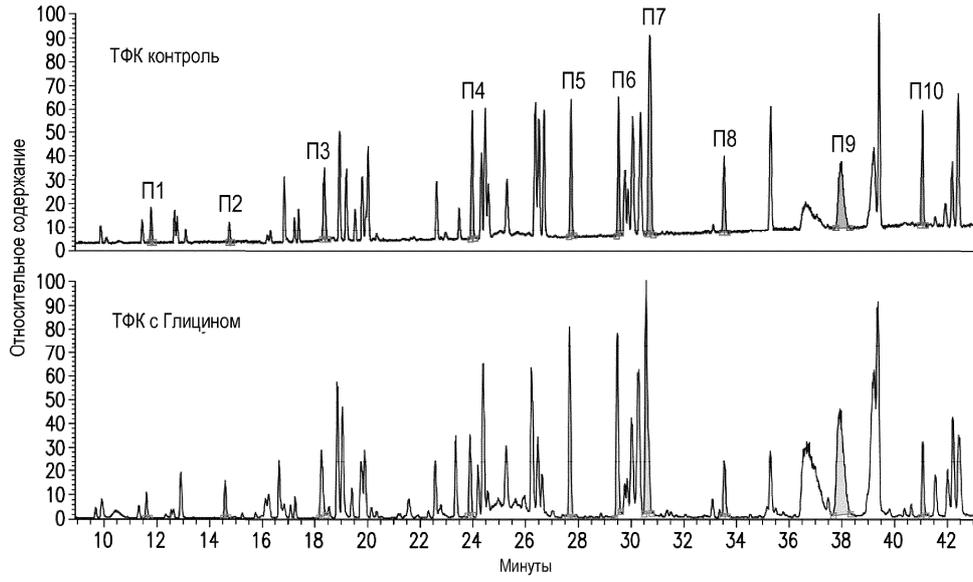
Фиг. 3



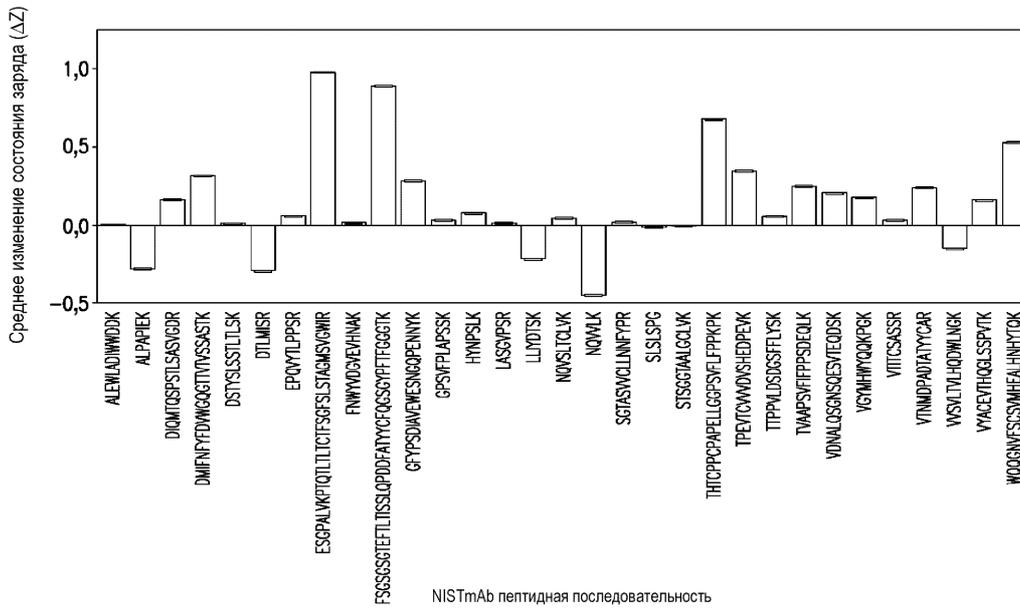
Фиг. 4



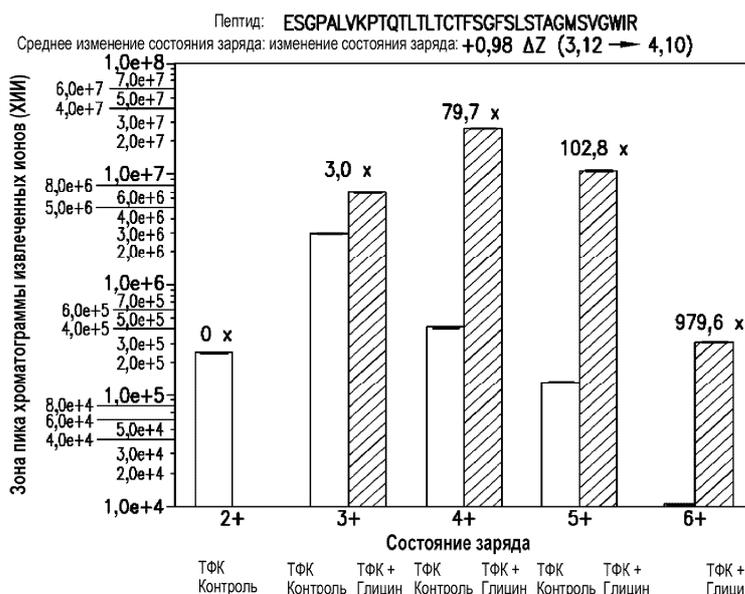
Фиг. 5



Фиг. 6

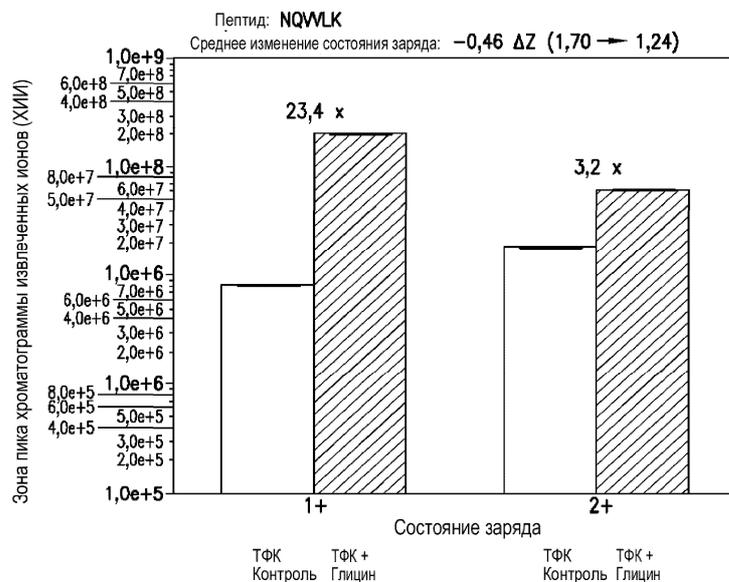


Фиг. 7



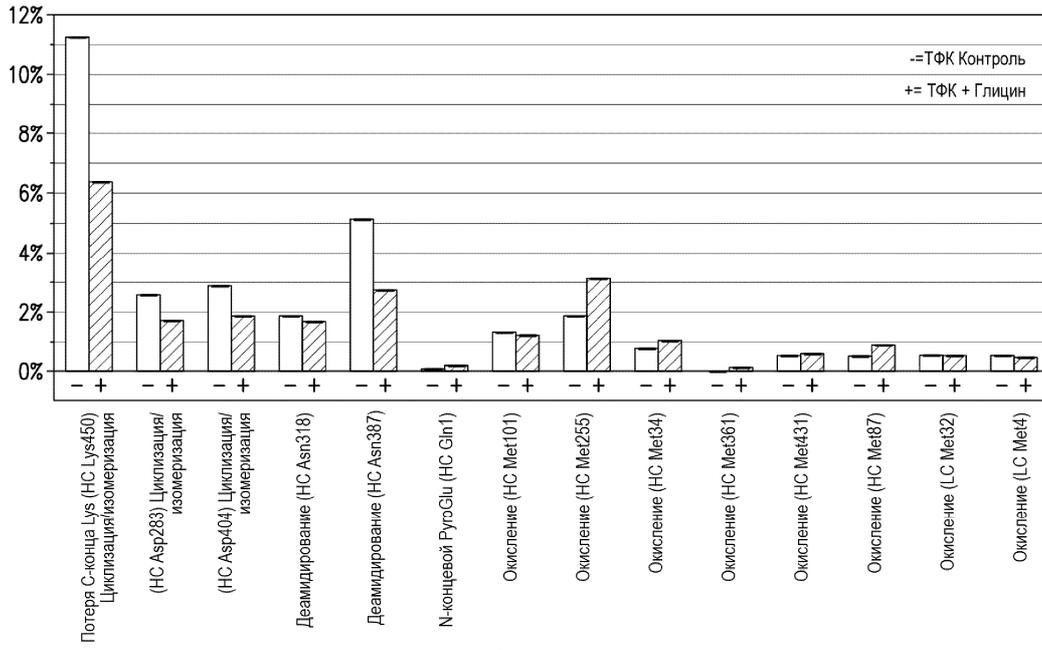
$$Z_{\text{смены}} = \sum \left[\frac{\text{Сигнал}_{\text{п(глицин)}}}{\text{Сигнал}_{\text{общий(глицин)}}} * Z_{\text{п(глицин)}} \right] - \sum \left[\frac{\text{Сигнал}_{\text{п(контроль)}}}{\text{Сигнал}_{\text{общий(контроль)}}} * Z_{\text{п(контроль)}} \right], \text{ п= каждое обнаруживаемое состояние заряда}$$

Фиг. 8А

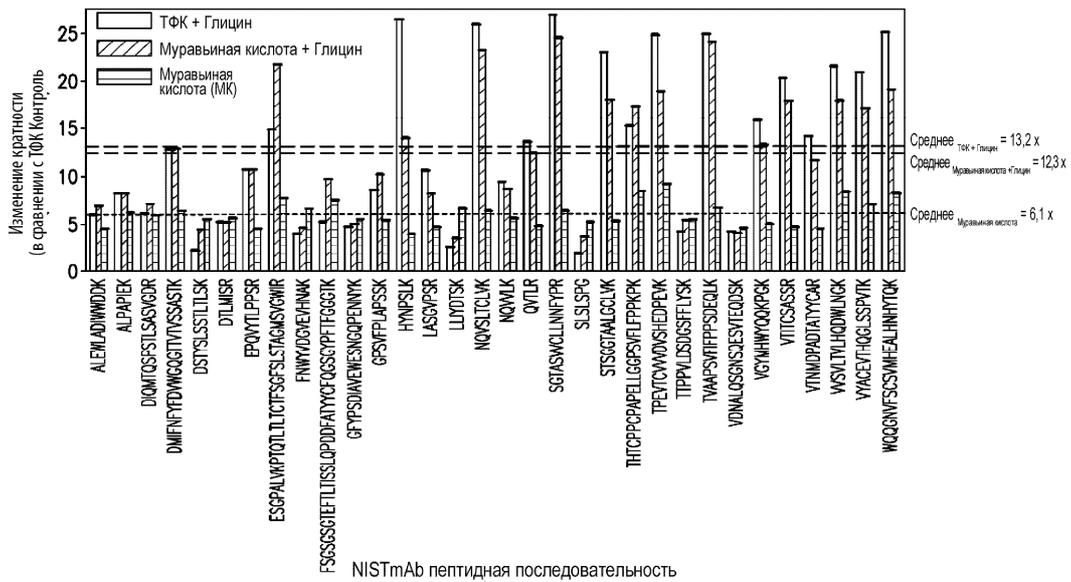


$$Z_{\text{смены}} = \sum \left[\frac{\text{Сигнал}_{\text{п(глицин)}}}{\text{Сигнал}_{\text{общий(глицин)}}} * Z_{\text{п(глицин)}} \right] - \sum \left[\frac{\text{Сигнал}_{\text{п(контроль)}}}{\text{Сигнал}_{\text{общий(контроль)}}} * Z_{\text{п(контроль)}} \right], \text{ п= каждое обнаруживаемое состояние заряда}$$

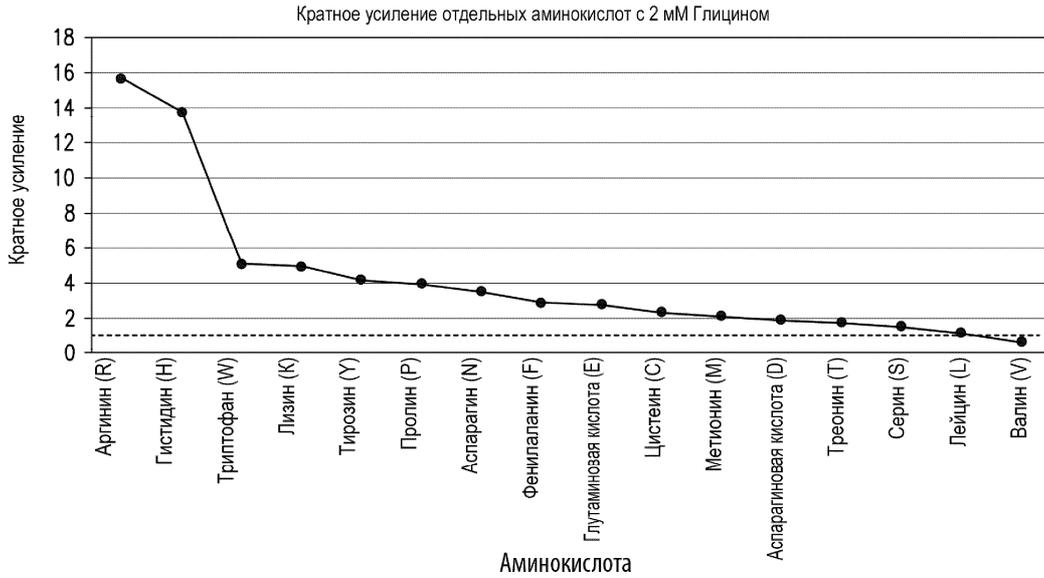
Фиг. 8В



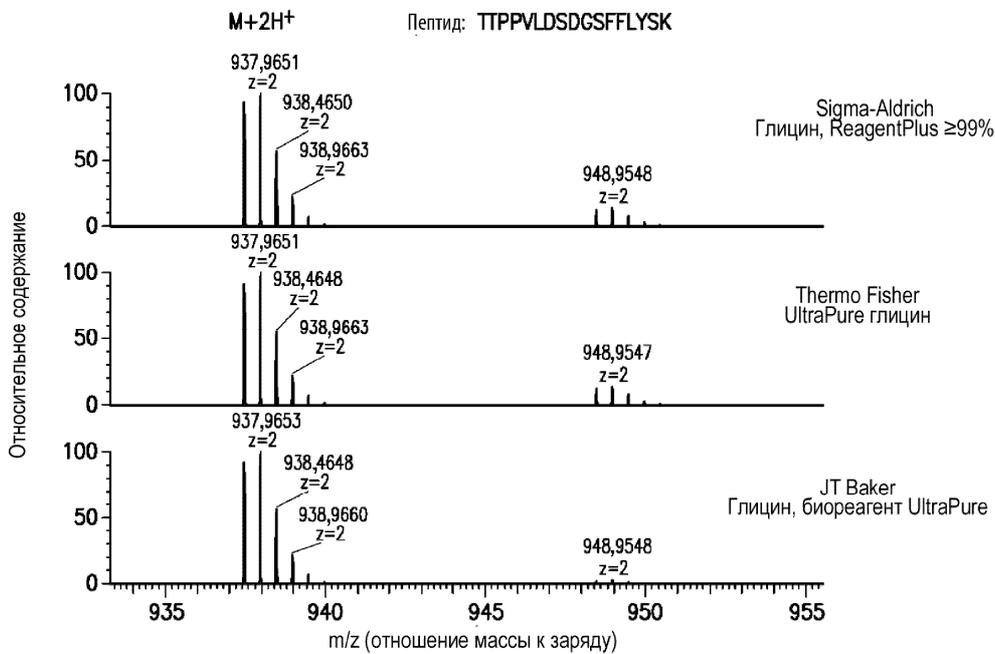
Фиг. 9



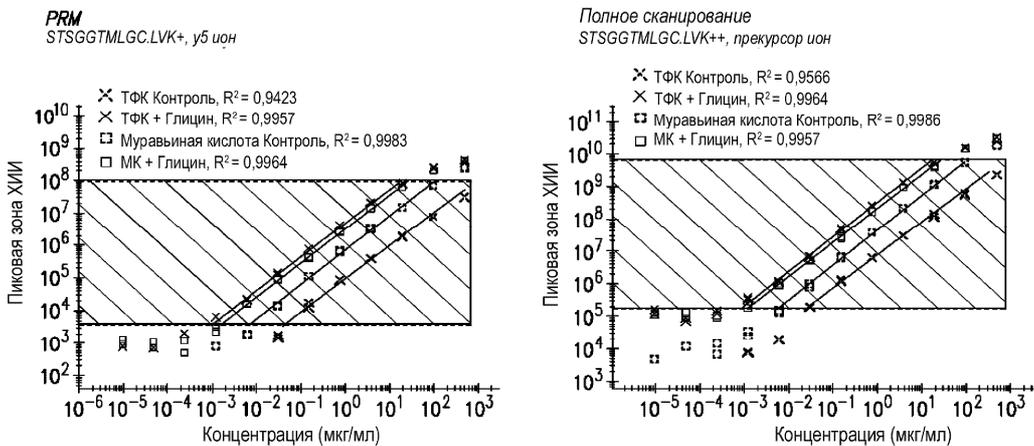
Фиг. 10



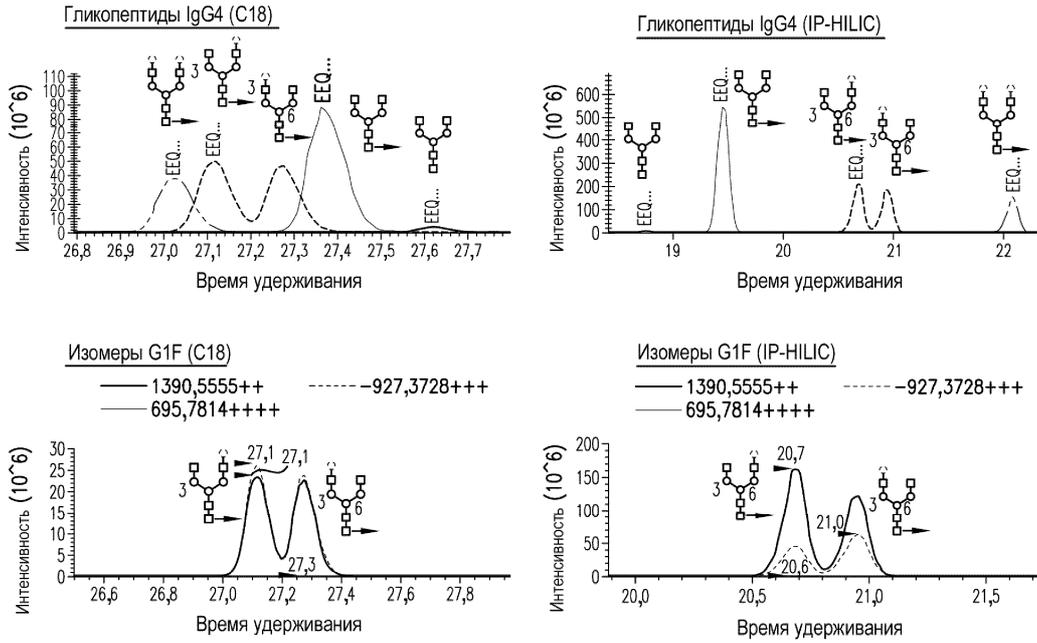
Фиг. 11



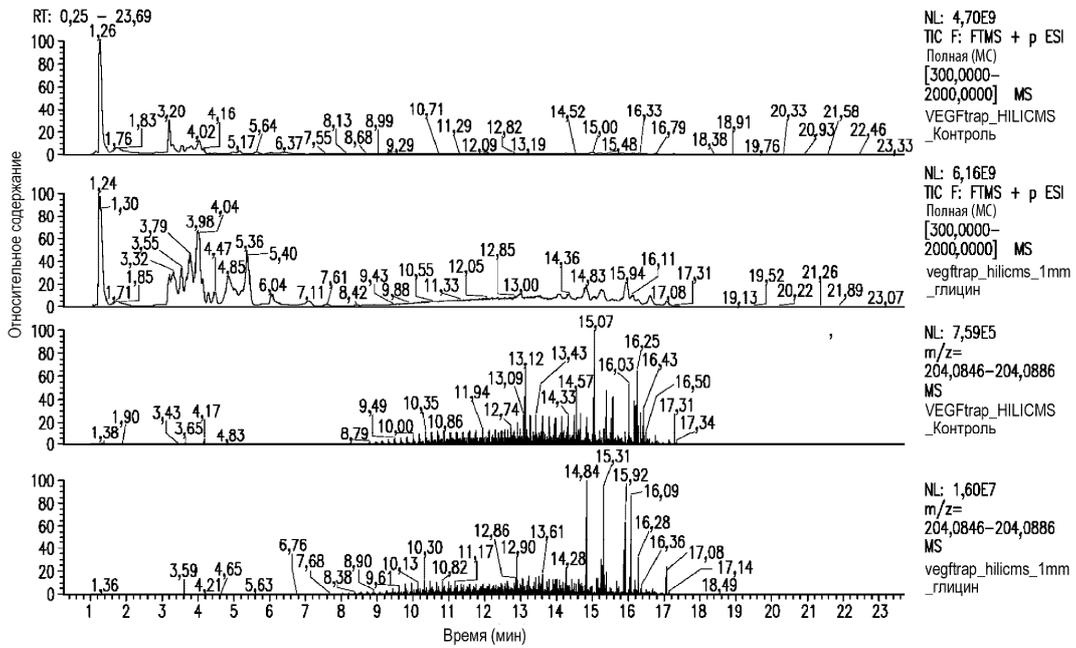
Фиг. 12



Фиг. 13

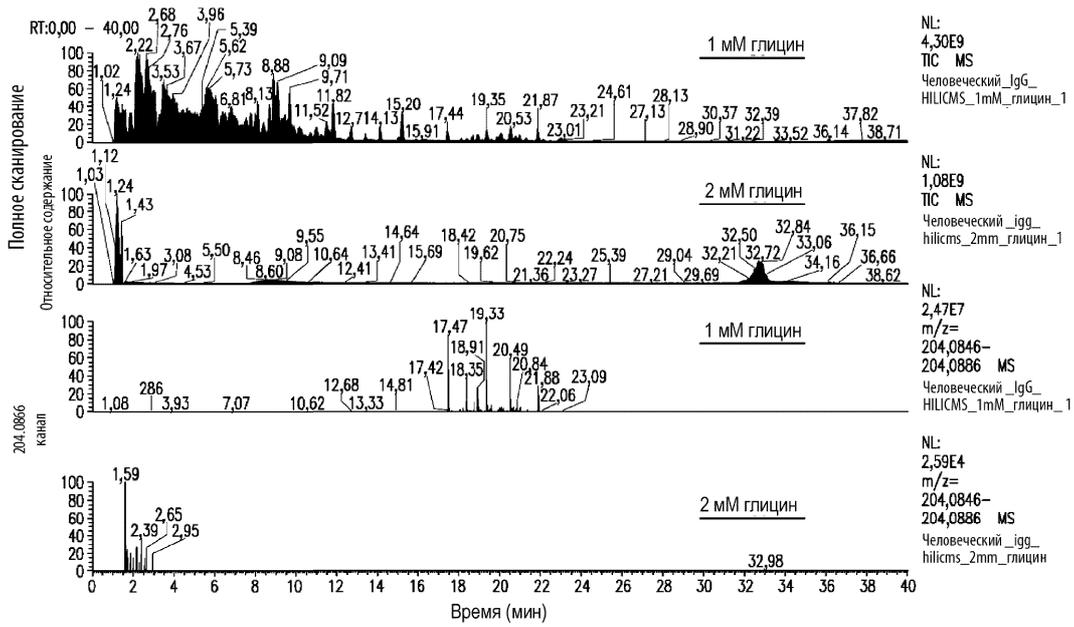


Фиг. 14

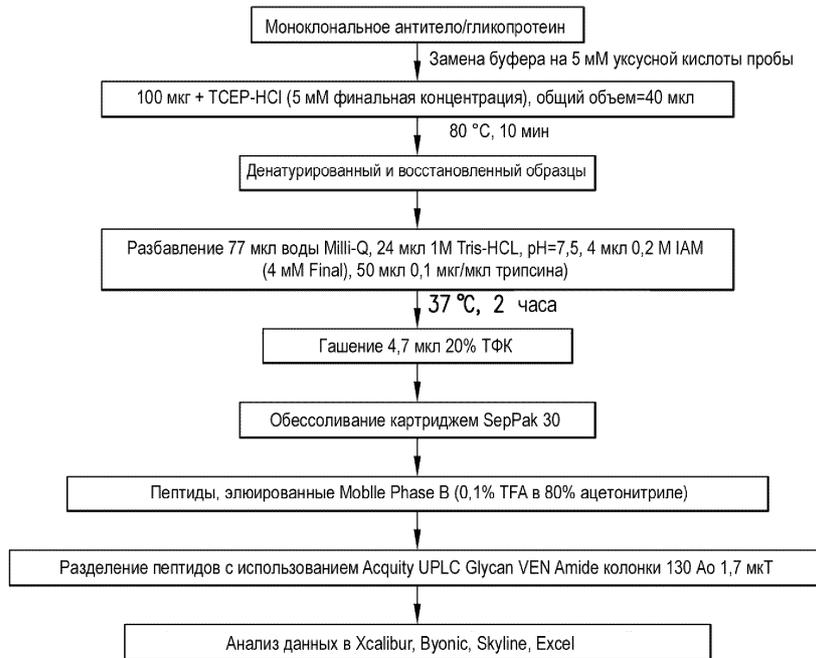


Фиг. 15

047025

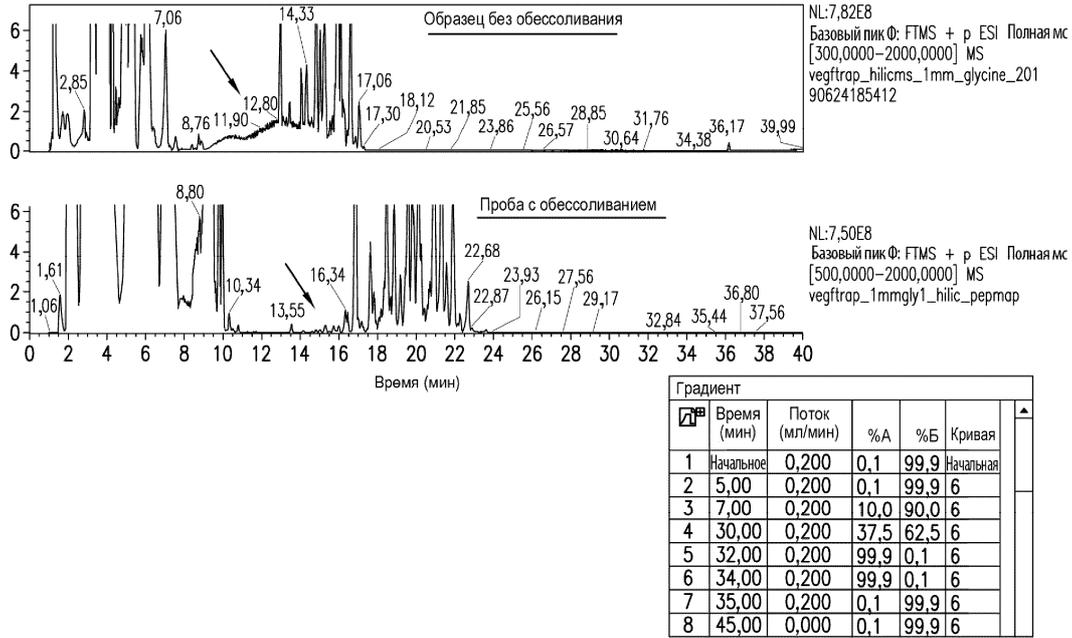


Фиг. 16



Фиг. 17

047025



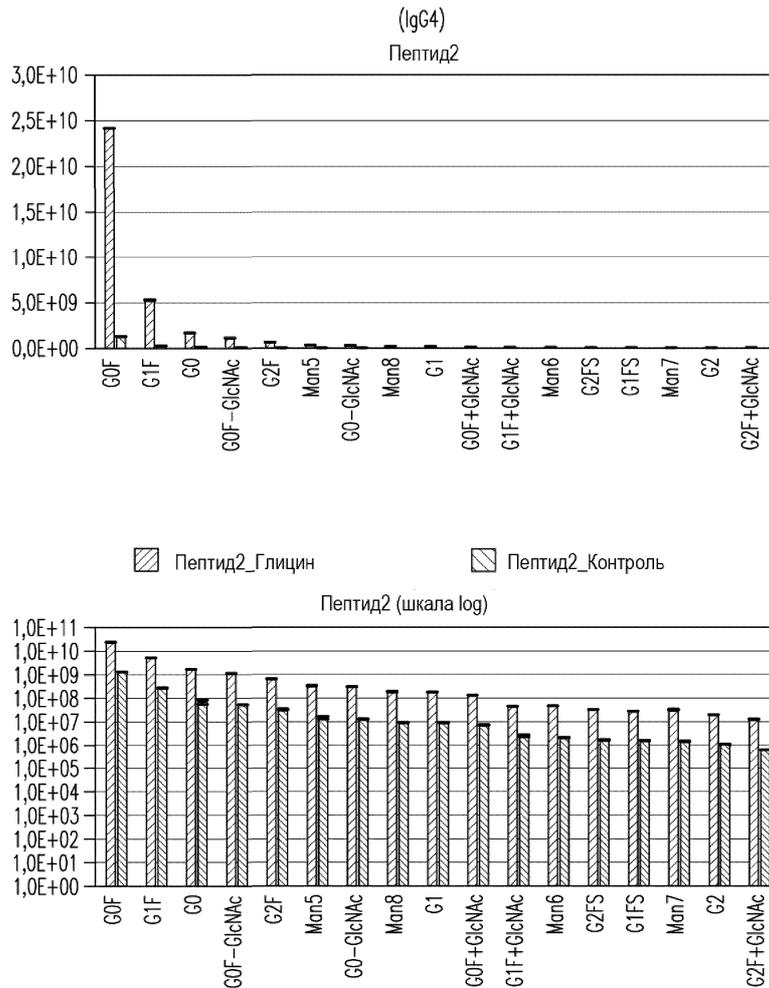
Фиг. 18

Гликан *	Средняя площадь пика**		Среднее изменение кратности	Относительный уровень	
	Пептид 1 _ глицин	Пептид 1 _Контроль		Пептид 1 _ глицин	Пептид 1 _Контроль
G0F	1,2e10 ± 8,3e7	7,5e8 ± 7,5e7	16,6	43,2% ± 0,1%	46,5% ± 0,7%
G1F	9,1e9 ± 6,0e7	5,1e8 ± 6,8e7	17,7	31,5% ± 0,1%	31,7% ± 0,5%
G0	2,7e9 ± 6,3e7	1,4e8 ± 1,6e7	19,5	9,2% ± 0,1%	8,4% ± 0,0%
G2F	1,7e9 ± 1,7e7	7,7e7 ± 1,1e7	22,7	6,0% ± 0,0%	4,7% ± 0,1%
G1	9,4e8 ± 2,1e7	4,3e7 ± 6,0e6	21,5	3,2% ± 0,0%	2,7% ± 0,1%
Man5	5,3e8 ± 2,8e6	2,3e7 ± 2,8e6	22,8	1,8% ± 0,0%	1,4% ± 0,0%
G0F-GlcNAc	4,2e8 ± 2,7e6	2,3e7 ± 2,4e6	18,5	1,5% ± 0,0%	1,4% ± 0,0%
G1F-GlcNAc	2,2e8 ± 4,7e6	1,0e7 ± 1,3e6	21,8	0,77% ± 0,01%	0,63% ± 0,01%
G0-GlcNAc	1,8e8 ± 3,8e5	1,0e7 ± 1,3e6	17,6	0,63% ± 0,00%	0,64% ± 0,00%
Man3	1,1e8 ± 3,1e5	6,0e6 ± 6,7e5	18,8	0,39% ± 0,00%	0,37% ± 0,00%
G1-GlcNAc	7,6e7 ± 1,9e6	3,8e6 ± 5,4e5	20,3	0,27% ± 0,00%	0,23% ± 0,01%
G2	7,7e7 ± 1,0e6	4,2e6 ± 5,2e5	18,6	0,27% ± 0,00%	0,26% ± 0,00%
G2FS	5,9e7 ± 1,9e6	3,0e6 ± 4,7e5	19,5	0,20% ± 0,00%	0,19% ± 0,01%
Man6	3,8e7 ± 1,4e6	2,0e6 ± 2,4e5	19,3	0,13% ± 0,00%	0,12% ± 0,00%
Man8	3,4e7 ± 1,2e6	2,0e6 ± 2,6e5	16,9	0,12% ± 0,00%	0,13% ± 0,00%
G0FB	3,3e7 ± 5,8e5	1,9e6 ± 2,3e5	17,9	0,12% ± 0,00%	0,11% ± 0,00%
Man4_G1	2,9e7 ± 1,7e6	1,5e6 ± 1,4e5	20,0	0,10% ± 0,01%	0,09% ± 0,00%
Man7	2,7e7 ± 7,4e5	1,3e6 ± 1,6e5	20,9	0,09% ± 0,00%	0,08% ± 0,00%
G1F+GlcNAc	2,5e7 ± 1,8e5	1,2e6 ± 1,9e5	21,4	0,09% ± 0,00%	0,08% ± 0,00%
G0F+GlcNAc	2,7e7 ± 2,7e5	1,3e6 ± 1,6e5	20,6	0,09% ± 0,00%	0,07% ± 0,00%
Man5_G1	2,1e7 ± 5,1e5	1,1e6 ± 1,8e5	18,8	0,07% ± 0,00%	0,07% ± 0,00%
G1FS-GlcNAc	1,8e7 ± 2,4e4	1,1e6 ± 1,6e5	16,8	0,06% ± 0,00%	0,07% ± 0,00%
Man4	1,1e7 ± 8,7e4	4,1e5 ± 1,3e5	27,0	0,04% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%
Man3F	8,2e6 ± 2,4e5	4,4e5 ± 6,6e4	18,9	0,03% ± 0,00%	0,03% ± 0,00%
G0B	5,9e6 ± 3,7e5	2,5e5 ± 5,7e4	23,1	0,02% ± 0,00%	0,02% ± 0,00%
Man5F	2,3e6 ± 7,7e3	ND	---	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Man4F	1,1e7 ± 8,8e6	ND	---	0,04% ± 0,03%	0,00% ± 0,00%

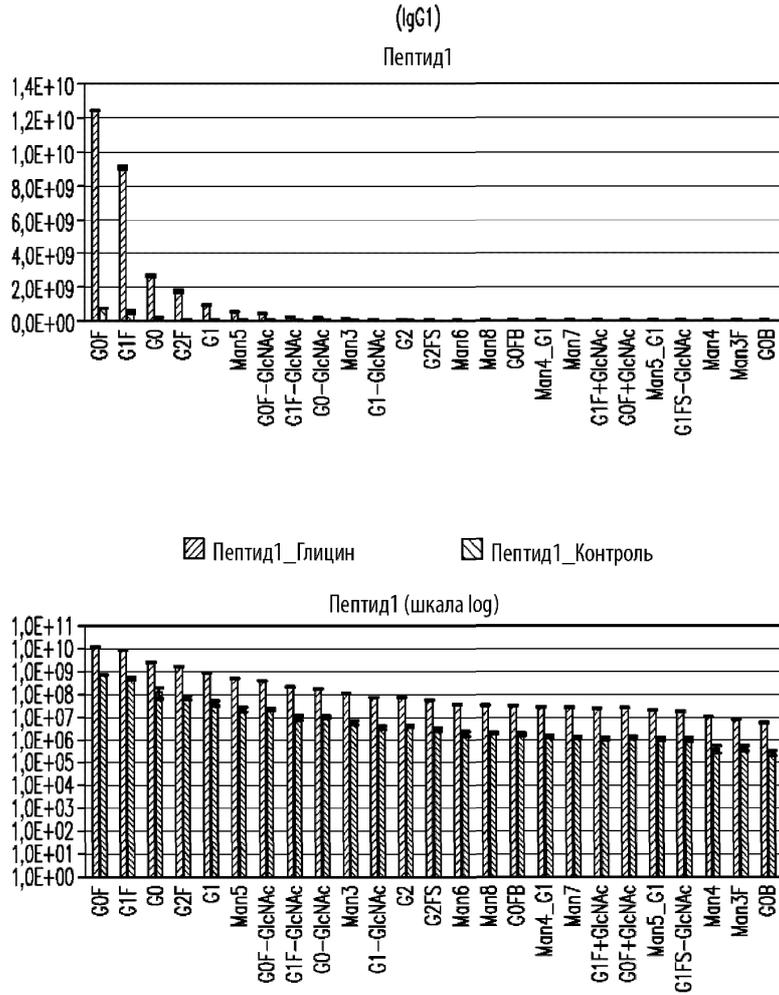
Фиг. 19

Гликан *	Средняя площадь пика**		Изменение кратности***	Относительный уровень	
	Пептид2	Пептид2		Пептид2	Пептид2
	+Глицин	Контроль	Пептид2	+Глицин	Контроль
G0F	2,4e10 ± 4,5e7	1,3e9 ± 9,2e6	18,4	70,4% ± 0,1%	72,6% ± 0,7%
G1F	5,3e9 ± 5,9e6	2,8e8 ± 1,6e7	19,2	15,4% ± 0,0%	15,2% ± 0,6%
G0	1,7e9 ± 2,2e7	7,2e7 ± 3,9e5	23,7	5,0% ± 0,0%	4,0% ± 0,0%
G0F-GlcNAc	1,1e9 ± 1,2e7	5,3e7 ± 1,8e6	21,4	3,3% ± 0,0%	2,9% ± 0,1%
G2F	6,6e8 ± 1,6e7	3,3e7 ± 1,8e6	20,1	1,9% ± 0,0%	1,8% ± 0,1%
Man5	3,4e8 ± 2,7e6	1,5e7 ± 4,3e5	22,9	1,0% ± 0,0%	0,80% ± 0,0%
G0-GlcNAc	3,1e8 ± 7,3e6	1,3e7 ± 4,2e5	23,8	0,89% ± 0,02%	0,71% ± 0,01%
Man8	1,9e8 ± 3,3e6	9,3e6 ± 3,1e5	20,1	0,54% ± 0,01%	0,51% ± 0,01%
G1	1,8e8 ± 9,0e5	9,2e6 ± 2,1e5	19,4	0,50% ± 0,00%	0,50% ± 0,00%
G0F+GlcNAc	1,3e8 ± 6,7e5	7,2e6 ± 2,2e5	18,1	0,38% ± 0,00%	0,40% ± 0,01%
Man6	4,7e7 ± 1,2e5	2,1e6 ± 9,7e4	22,1	0,14% ± 0,00%	0,12% ± 0,00%
G1F+GlcNAc	4,5e7 ± 4,5e5	2,6e6 ± 7,9e4	17,6	0,13% ± 0,00%	0,14% ± 0,00%
G2FS	3,2e7 ± 3,2e4	1,7e6 ± 2,5e4	19,4	0,09% ± 0,00%	0,09% ± 0,00%
Man7	3,2e7 ± 1,2e5	1,5e6 ± 6,4e4	22,1	0,09% ± 0,00%	0,08% ± 0,00%
G1FS	2,8e7 ± 1,3e6	1,6e6 ± 5,2e4	17,7	0,08% ± 0,00%	0,09% ± 0,00%
G2	2,0e7 ± 5,7e5	1,1e6 ± 1,9e4	18,8	0,06% ± 0,00%	0,06% ± 0,00%
G2F+GlcNAc	1,3e7 ± 7,5e5	6,1e5 ± 2,2e4	20,7	0,04% ± 0,00%	0,03% ± 0,00%
G2FS2	4,4e6 ± 4,6e4	7,9e4 ± 1,1e4	(55,9)	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
G3F	2,5e6 ± 1,9e5	5,4e4 ± 7,5e3	(47,0)	0,01% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%

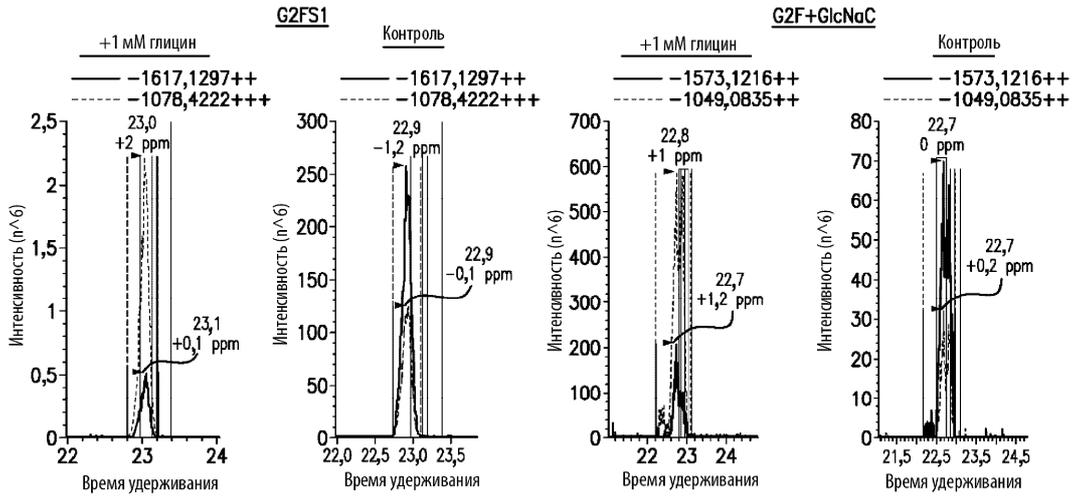
Фиг. 20



Фиг. 21А

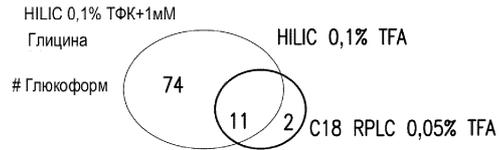


Фиг. 21В



Фиг. 22

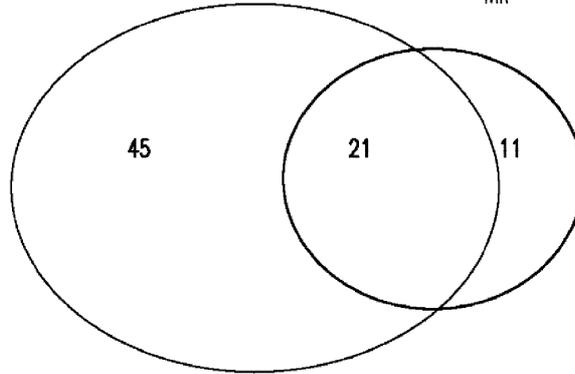
Подвижная фаза	N36		N68		N123		N196		N282		Общее	
	# PSM	# Глюкоформ										
HILIC 0,1% ТФК	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2
C18 (RPLC) 0,05% ТФК	16	6	5	3	8	3	2	1	3	2	34	15
HILIC 0,1% ТФК+1мМ Глицина	15	9	45	12	112	23	139	31	29	12	340	87



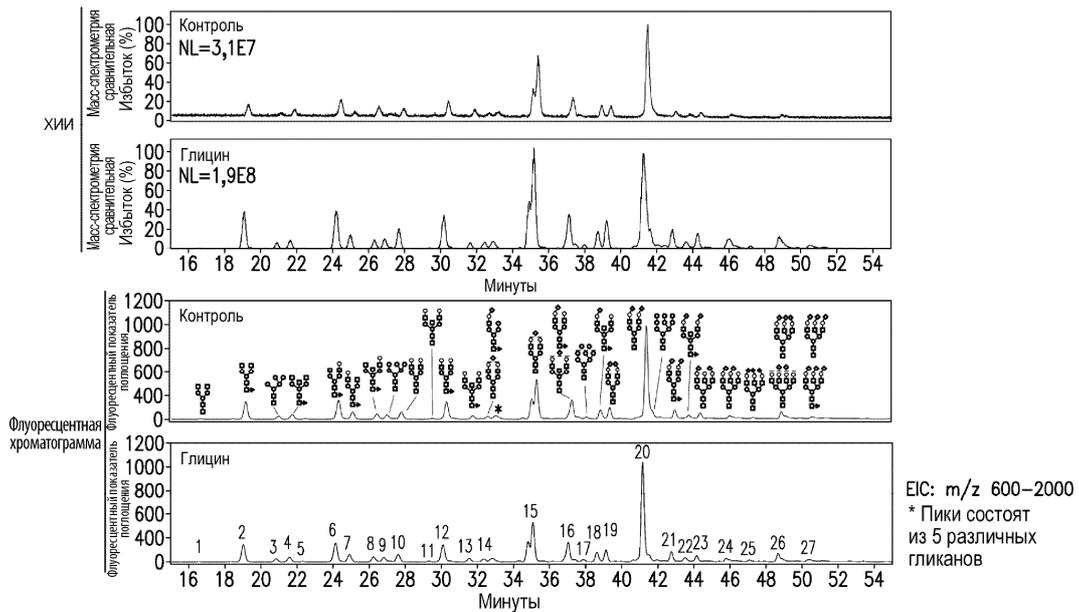
Фиг. 23

ТФК + Глицин

МК



Фиг. 24

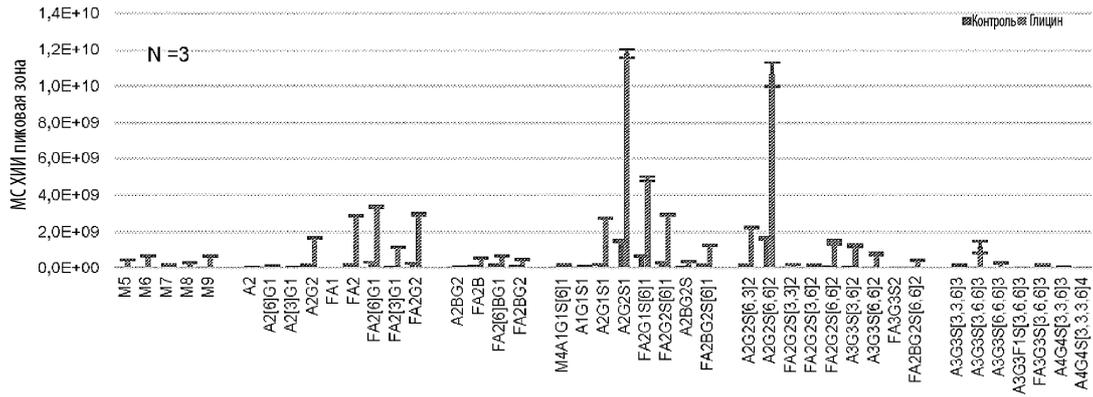


Фиг. 25

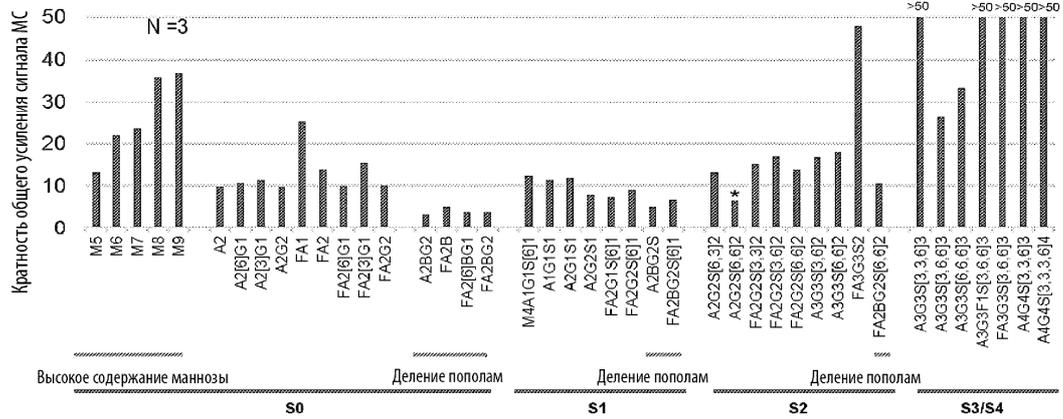
Состав	Среднее состояние заряда		Общее усиление сигнала МС глицином
	Контроль	Глицин	
M5	1,6	1,9	13,1
M6	1,7	1,9	21,9
M7	1,9	2,0	23,3
M8	1,8	2,0	35,6
M9	2,0	2,0	36,9
A2	1,5	1,9	9,8
A2[6]G1	1,8	2,0	10,6
A2[3]G1	1,6	2,0	11,4
A2G2	1,9	2,0	9,6
FA1	1,5	1,9	25,1
FA2	1,6	2,0	13,8
FA2[6]G1	1,9	2,0	9,9
FA2[3]G1	1,7	2,0	15,4
FA2G2	2,0	2,0	10,1
A2BG2	2,0	2,3	3,1
FA2B	1,8	2,0	5,1
FA2[6]BG1	2,0	2,1	3,6
FA2BG2	2,0	2,3	3,6
M4A1G1S[6]1	2,0	2,0	12,2
A1G1S1	1,9	2,0	11,4
A2G1S1	2,0	2,0	11,8
A2G2S1	2,0	2,2	7,9
FA2G1S[6]1	2,0	2,0	7,3
FA2G2S[6]1	2,0	2,3	9,0
A2BG2S	2,0	2,6	5,1
FA2BG2S[6]1	2,0	2,7	6,6
A2G2S[6,3]2	2,0	2,6	13,1
A2G2S[6,6]2	2,0	2,6	6,5
FA2G2S[3,3]2	2,0	2,6	15,0
FA2G2S[3,6]2	2,0	2,7	16,8
FA2G2S[6,6]2	2,0	2,7	13,8
A3G3S[3,6]2	2,0	2,8	16,6
A3G3S[6,6]2	2,0	2,8	18,0
FA3G3S2	2,0	2,9	47,9
FA2BG2S[6,6]2	2,0	2,8	10,5
A3G3S[3,3,6]3	-	2,9	∞
A3G3S[3,6,6]3	2,2	2,9	26,3
A3G3S[6,6,6]3	2,1	2,9	33,3
A3G3F1S[3,6,6]3	-	3,0	∞
FA3G3S[3,6,6]3	-	3,0	∞
A4G4S[3,3,6]3	-	3,0	∞
A4G4S[3,3,3,6]4	-	3,0	∞

N=3

Фиг. 26А

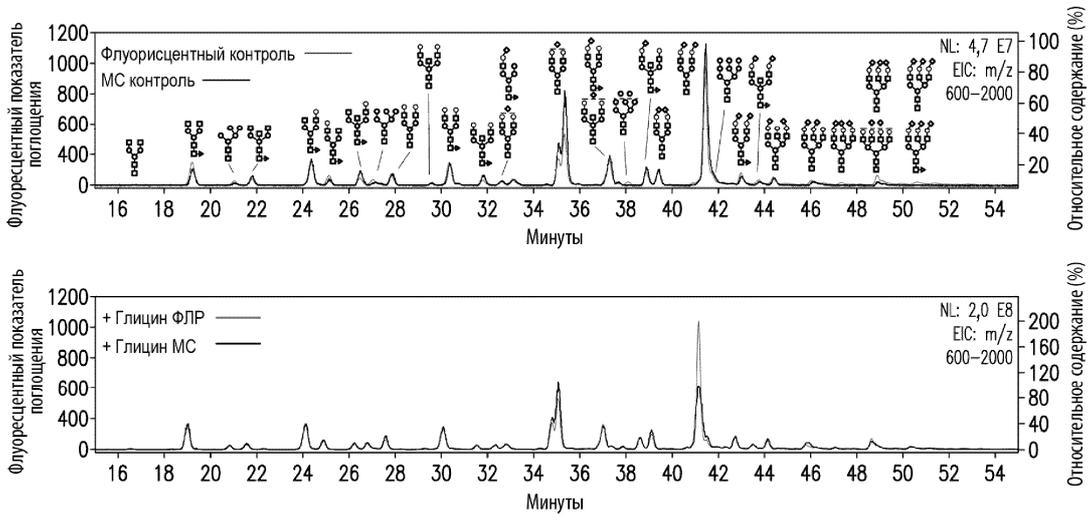


Фиг. 26В



*МС-сигналы с подвижными фазами глицина были сатурированы

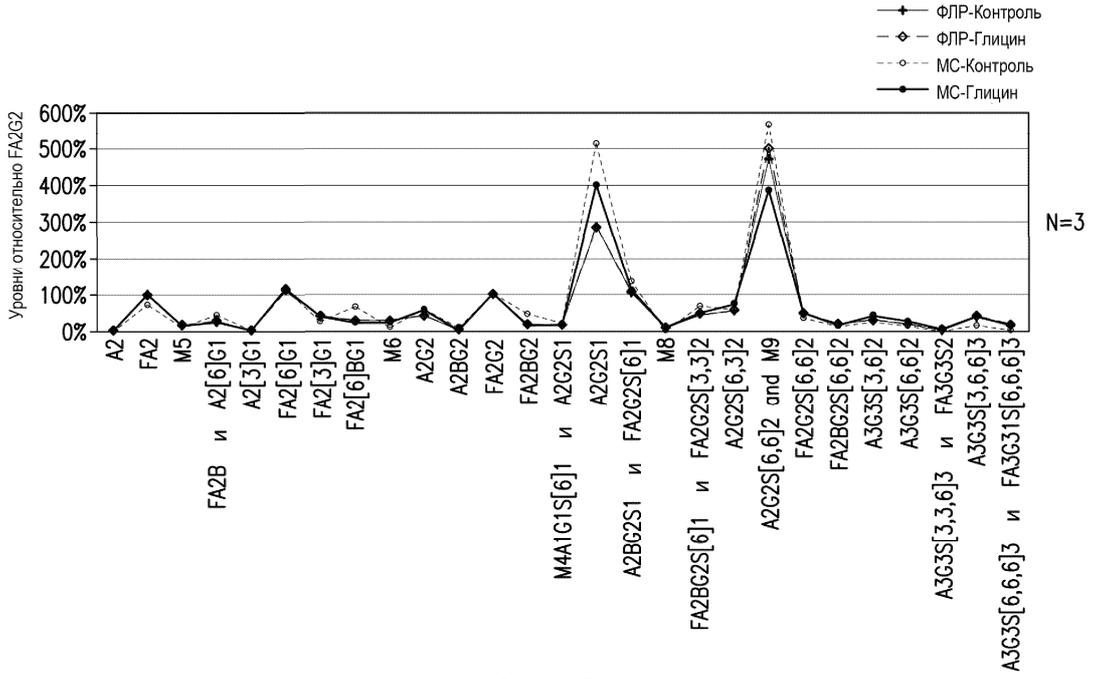
Фиг. 26С



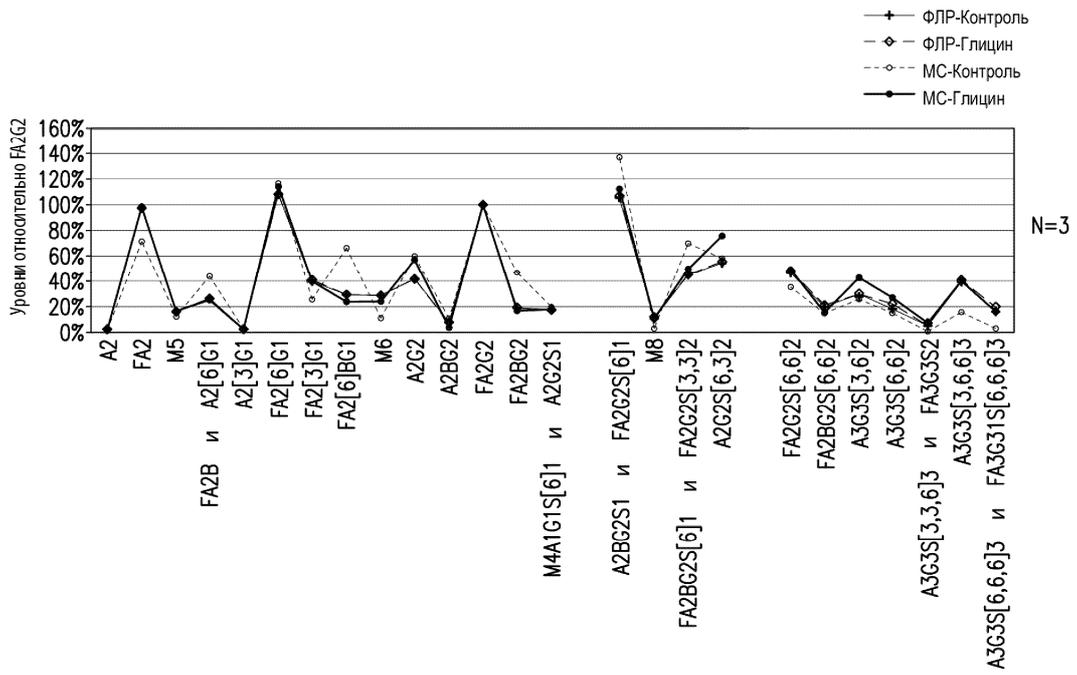
Фиг. 27

Пик#	Состав	Уровни Состава относительно FA2G2					
		FLR		МС			
		Контроль	Глицин	Контроль	Глицин		
1	A2	2,6%	2,6%	1,9%	1,8%		
2	FA2	97,2%	97,1%	71,4%	98,2%		
3	M5	16,4%	16,4%	12,4%	16,1%		
4	FA2B	26,6%	26,6%	38,8%	44,0%	19,5%	25,0%
	A2[6]G1			5,2%		5,5%	
5	A2[3]G1	2,8%	2,9%	2,2%	2,5%		
6	FA2[6]G1	109,4%	109,3%	116,3%	114,2%		
7	FA2[3]G1	40,6%	40,5%	26,0%	39,8%		
8	FA2[6]BG1	29,0%	29,0%	66,5%	24,0%		
9	M6	28,8%	28,8%	11,0%	23,9%		
10	A2G2	41,7%	41,6%	59,6%	57,1%		
11	A2BG2	7,0%	7,2%	11,0%	3,4%		
12	FA2G2	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%		
13	FA2BG2	19,2%	19,3%	46,7%	16,8%		
14	M4A1G1S[6]1	16,3%	16,4%	5,8%	19,7%	7,1%	18,3%
	A2G2S1			13,9%		11,2%	
15	A2G2S1	285,9%	285,3%	509,9%	399,8%		
16	A2BG2S1	105,3%	106,8%	25,4%	136,6%	12,8%	112,2%
	FA2G2S[6]1			111,3%		99,4%	
17	M8	11,7%	11,9%	2,9%	10,3%		
18	FA2BG2S[6]1	45,3%	45,0%	64,7%	69,6%	42,3%	49,7%
	FA2G2S[3,3]2			5,0%		7,4%	
19	A2G2S[6,3]2	54,9%	56,3%	57,9%	75,4%		
20	A2G2S[6,6]2	469,7%	498,6%	559,3%	565,7%	361,2%	384,5%
	M9			6,4%		23,3%	
21	FA2G2S[6,6]2	46,7%	48,3%	35,5%	48,6%		
22	FA2BG2S[6,6]2	19,1%	21,3%	15,1%	15,7%		
23	A3G3S[3,6]2	29,8%	30,1%	25,8%	42,6%		
24	A3G3S[6,6]2	18,5%	21,7%	15,0%	26,9%		
25	A3G3S[3,3,6]3	5,2%	5,3%	0,9%	1,2%	5,6%	6,9%
	FA3G3S2			0,3%		1,4%	
26	A3G3S[3,6,6]3	38,5%	40,8%	15,3%	39,9%		
27	A3G3S[6,6,6]3	17,5%	19,7%	3,1%	3,1%	10,2%	16,4%
	FA3G31S[6,6,6]3			0,0%		6,2%	

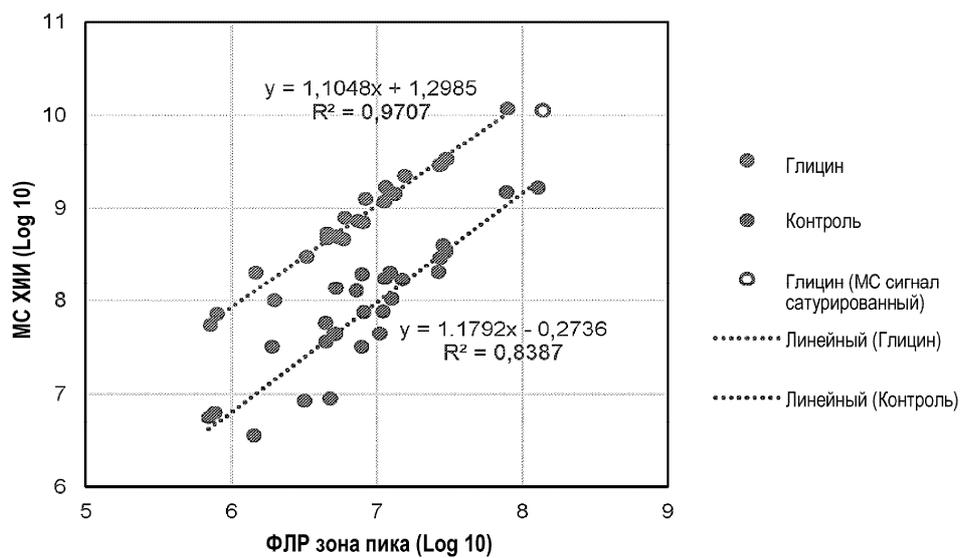
Фиг. 28А



Фиг. 28В



Фиг. 28С

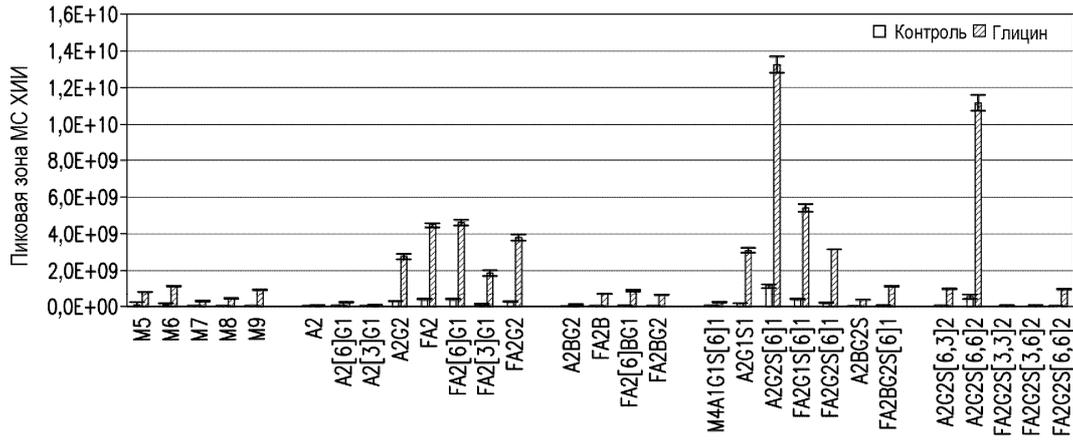


Фиг. 29

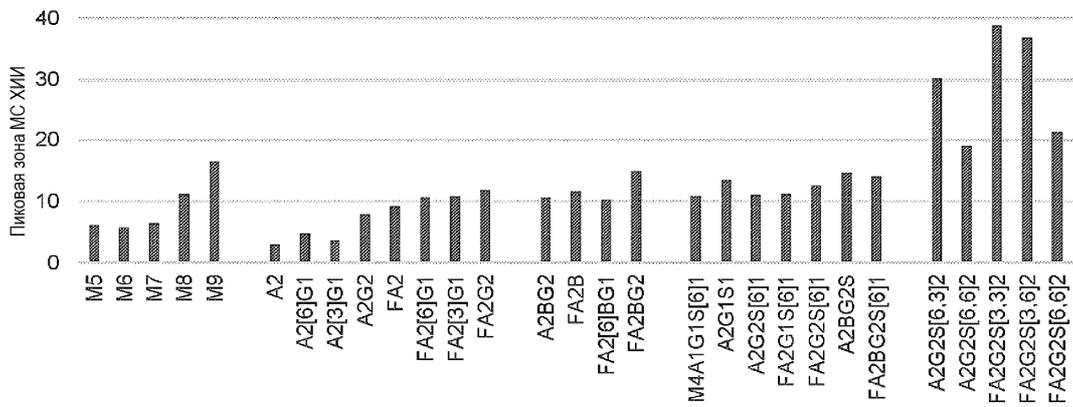
Состав	Среднее состояние заряда		Общее усиление сигнала глицином
	Контроль	Глицин	
M5	2,0	2,0	6,1
M6	2,0	2,0	5,7
M7	2,0	2,0	6,5
M8	2,0	2,0	11,2
M9	2,0	2,0	16,4
A2	2,0	2,0	2,8
A2[6]G1	2,0	2,0	4,7
A2[3]G1	2,0	2,0	3,7
A2G2	2,1	2,1	7,8
FA2	2,1	2,0	9,1
FA2[6]G1	2,1	2,0	10,6
FA2[3]G1	2,1	2,1	10,8
FA2G2	2,2	2,1	11,8
A2BG2	2,3	2,5	10,5
FA2B	2,0	2,0	11,6
FA2[6]BG1	2,2	2,2	10,3
FA2BG2	2,3	2,5	14,9
M4A1G1S[6]1	2,1	2,1	10,8
A2G1S1	2,1	2,0	13,4
A2G2S[6]1	2,4	2,4	11,0
FA2G1S[6]1	2,2	2,1	11,1
FA2G2S[6]1	2,4	2,5	12,6
A2BG2S	2,5	2,8	14,5
FA2BG2S[6]1	2,6	2,8	14,0
A2G2S[6,3]2	2,5	2,7	30,2
A2G2S[6,6]2	2,6	2,8	19,0
FA2G2S[3,3]2	2,4	2,7	38,7
FA2G2S[3,6]2	2,5	2,8	36,8
FA2G2S[6,6]2	2,6	2,9	21,3

N=3

Фиг. 30А



Фиг. 30B

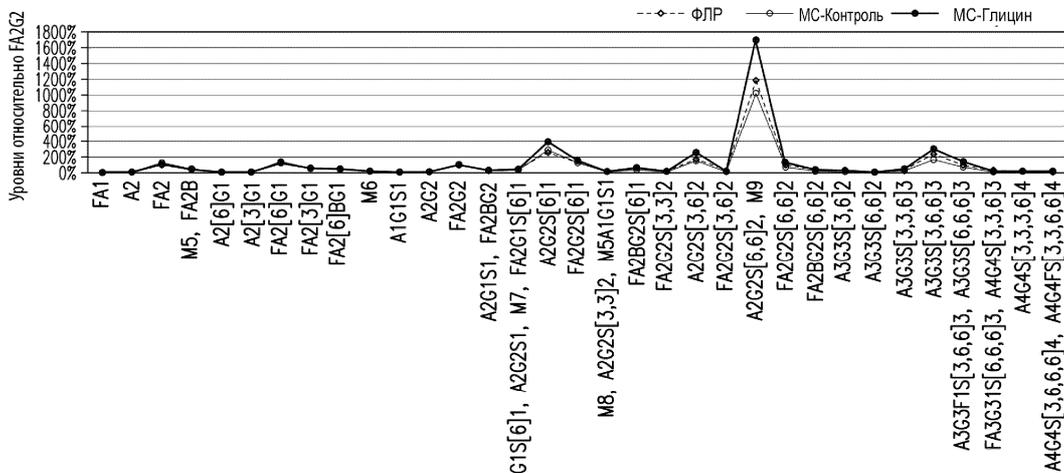


Фиг. 30C

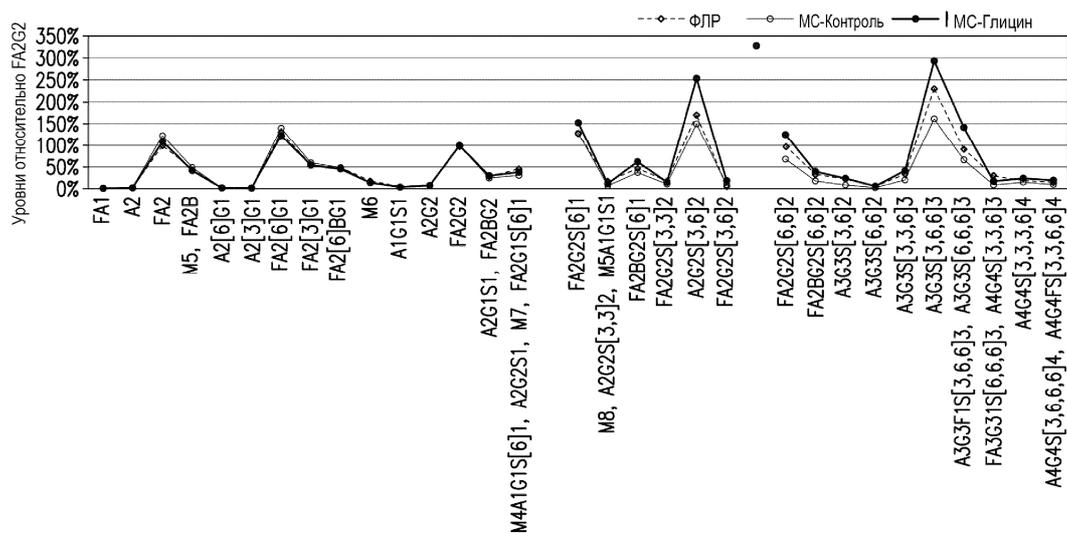
Состав	Уровни относительно FA2				Среднее состояние заряда		Общее усиление сигнала глицином	
	FLR	МС		Контроль	Глицин			
		Контроль	Контроль			Глицин		
FA1	0,7%	-	-	0,4%	2,0	2,0	-	
A2	1,8%	1,6%	-	2,2%	2,0	2,0	1,7	
FA2	102,6%	124,1%	-	110,2%	2,0	2,0	1,1	
M5	48,5%	14,8%	49,7%	13,9%	2,0	2,0	1,2	
FA2B		34,8%		27,6%	41,5%	2,0	2,0	1,0
A2[6]G1	2,5%	1,4%	-	2,3%	2,0	2,0	2,1	
A2[3]G1	1,7%	1,1%	-	1,6%	2,0	2,0	1,7	
FA2[6]G1	136,3%	140,8%	-	124,0%	2,0	2,0	1,1	
FA2[3]G1	56,7%	60,5%	-	54,6%	2,0	2,1	1,1	
FA2[6]BG1	49,2%	48,6%	-	46,2%	2,0	2,3	1,2	
M6	18,2%	14,1%	-	14,2%	1,9	2,0	1,2	
A1G1S1	4,1%	4,7%	-	5,1%	2,0	2,0	1,3	
A2G2	8,0%	7,5%	-	8,7%	2,0	2,1	1,4	
FA2G2	100,0%	100,0%	-	100,0%	2,0	2,1	1,2	
A2G1S1	27,0%	11,6%	24,6%	14,4%	31,0%	2,0	2,3	1,5
FA2BG2		13,0%		16,7%		2,0	2,6	1,6
M4A1G1S[6]1	47,1%	5,5%	30,1%	6,7%	38,9%	2,0	2,1	1,5
A2G2S1		5,9%		6,6%		2,0	2,2	1,4
M7		1,5%		3,5%		2,0	2,0	2,8
FA2G1S[6]1		17,2%		22,2%		2,0	2,3	1,6
A2G2S[6]1		266,6%		288,0%		390,5%	2,0	2,4
FA2G2S[6]1	131,1%	129,7%	154,1%	2,0	2,6	2,2		
M8	27,0%	2,8%	7,9%	4,7%	12,0%	2,0	2,0	2,1
A2G2S[3,3]2		2,3%		3,7%		2,0	2,7	2,0
M5A1G1S1		2,8%		3,6%		2,0	2,1	1,6
FA2BG2S[6]1	48,0%	37,7%	63,1%	2,0	2,8	2,1		
FA2G2S[3,3]2	18,6%	10,5%	15,8%	2,0	2,7	1,9		
A2G2S[3,6]2	175,8%	150,6%	254,5%	2,0	2,7	2,1		
FA2G2S[3,6]2	6,8%	9,3%	19,3%	2,0	2,8	2,6		
A2G2S[6,6]2	1221,0%	1010,0%	1024,3%	1684,0%	1701,8%	2,0	2,7	2,1
M9		14,3%	%	17,8%	%	2,0	2,0	1,5
FA2G2S[6,6]2	100,4%	68,6%	125,9%	2,0	2,8	2,3		
FA2BG2S[6,6]2	33,7%	19,4%	41,2%	2,2	2,9	2,6		
A3G3S[3,6]2	24,8%	9,6%	24,8%	2,2	3,0	3,2		
A3G3S[6,6]2	7,6%	2,3%	6,4%	2,0	3,0	3,4		
A3G3S[3,3,6]3	34,7%	21,0%	41,9%	2,5	3,0	2,5		
A3G3S[3,6,6]3	236,3%	161,5%	294,7%	2,5	3,0	2,3		
A3G3F1S[3,6,6]3	94,3%	39,7%	67,4%	74,4%	142,4%	2,6	3,0	2,3
A3G3S[6,6,6]3		27,6%		68,0%		2,1	3,0	3,0
FA3G31S[6,6,6]3	30,8%	-	8,5%	2,4%	17,3%	2,7	3,0	-
A4G4S[3,3,6]3		8,5%		15,0%		3,0	3,0	2,2
A4G4S[3,3,6]4	19,2%	15,2%	24,5%	2,9	3,1	2,0		
A4G4S[3,6,6,6]4	15,7%	9,9%	9,9%	17,6%	20,2%	3,0	3,0	2,2
A4G4FS[3,3,6,6]4		-		2,6%		3,0	3,0	-

N=3

Фиг. 31А



Фиг. 31В



Фиг. 31С

Состав	Среднее состояние заряда		Общее усиление сигнала глицином
	Контроль	Глицин	
A2	1,0	1,3	0,9
FA2	1,1	1,5	2,3
FA2B	1,5	1,9	1,8
M5	1,0	1,0	0,8
FA2[6]G1	1,1	1,7	2,4
FA2[3]G1	1,1	1,8	2,2
FA2[6]BG1	1,7	2,0	1,7
M6	1,0	1,0	0,6
A2G2	1,2	1,9	2,9
FA2G2	1,4	1,9	2,2
FA2BG2	1,9	2,0	1,3
FA2G1S[6]1	1,8	2,0	1,6
A2G2S[6]1	1,6	2,0	2,1
FA2G2S[6]1	1,8	2,0	1,1
FA2BG2S[6]1	2,0	2,0	0,7
A2G2S[3,6]2	1,9	2,0	0,8
A2G2S[6,6]2	1,8	2,0	1,2
M9	1,3	1,9	1,5
FA2G2S[6,6]2	2,0	2,0	0,7
FA2BG2S[6,6]2	2,0	2,0	0,6
A3G3S[3,6,6]3	2,0	2,2	0,6
A3G3S[6,6,6]3	2,0	2,1	0,5
A3G3F1S[3,6,6]3	2,0	2,2	0,3
FA3G31S[6,6,6]3	2,0	2,3	0,4

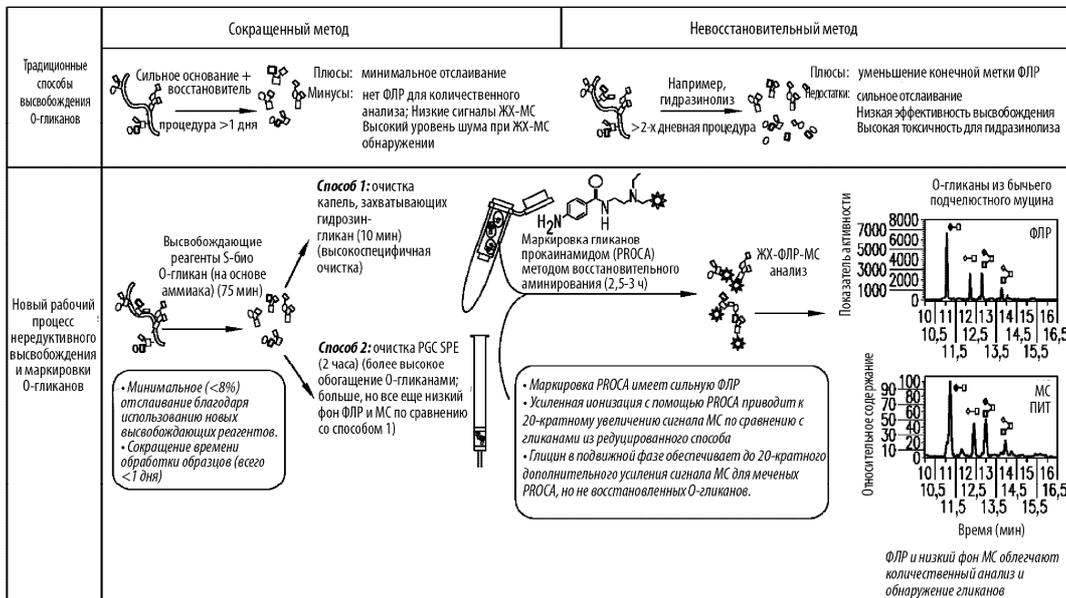
Фиг. 32

Система УПЛК	Waters Acquity UPLC 1-класса				
Мобильная фаза	А: 50 mM формиат аммония, pH 4,4, с 1 mM глицином или без него				
	Б: 15% 50 mM формиат аммония, pH 4,4/85% ацетонитрил, с или без 1 mM общей концентрации глицина				
Колонка	ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130A, 1,7 мкм, 2,1x150 мм, Waters (№ по каталогу: 186004742)				
Температура колонки	60°C ± 1°C				
Температура автосемплера	10°C ± 4°C				
Градиент	Время (мин)	% А	% Б	Поток (мл/мин)	Изгиб
	Начальный	11,8	88,2	0,45	Начальный
	29	20,2	79,8	0,45	Линейный
	65	25,3	64,7	0,45	Линейный
	66,5	100,0	0,0	0,2	Изократический
	69,5	100,0	0,0	0,2	Линейный
	74	11,8	88,2	0,2	Изократический
	77	11,8	88,2	0,45	Изократический
85	11,8	88,2	0,45	Изократический	
Длина волны детектора для меченых PROCA гликанов	Длина волны возбуждения при 310 нм и длина волны излучения при 370 нм Коэффициент усиления PMT установлен на 1,00				

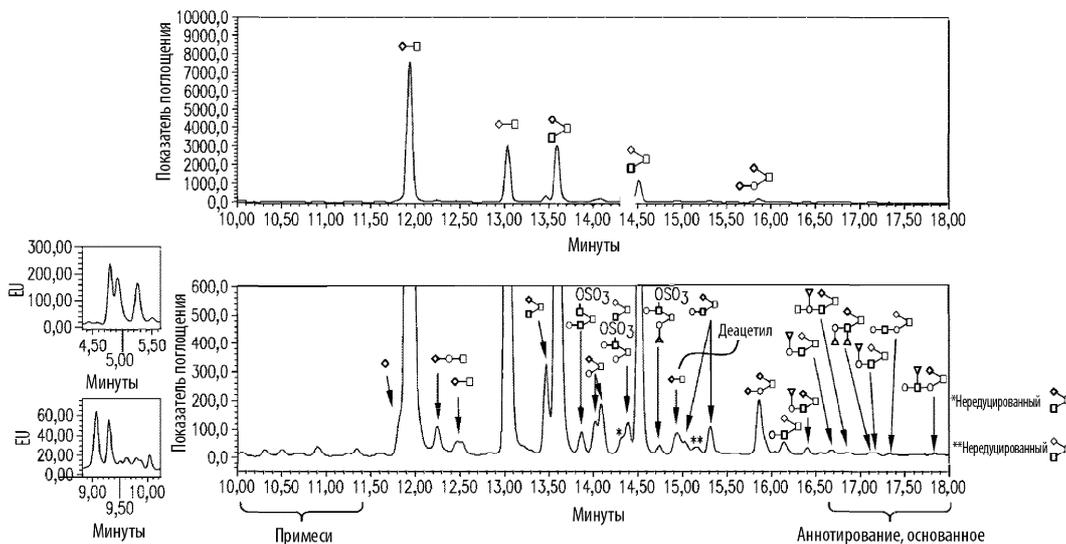
Настройки MS Tune для анализа N-гликанов

- Полярность: положительная
- Напряжение распыления: 3,8 кВ
- Температура капилляра: 350°C
- Защитный газ: 40
- Вспомогательный газ: 10
- Температура нагревателя зонда: 250°C
- Уровень RF S-Lens: 50
- ион Источник: HESI
- Диапазон: от 400 до 2000 m/z

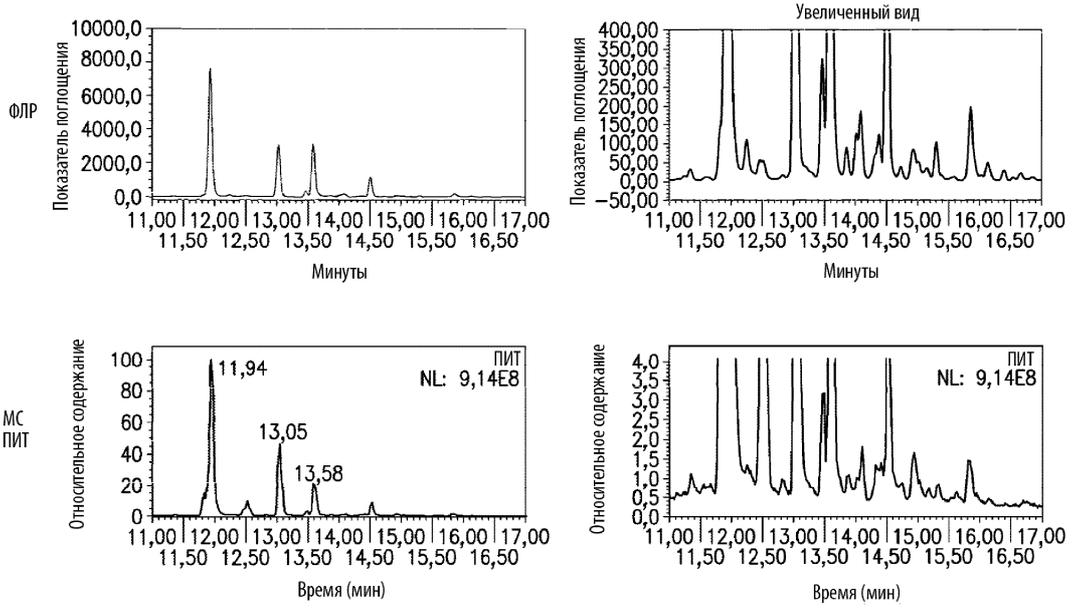
Фиг. 33



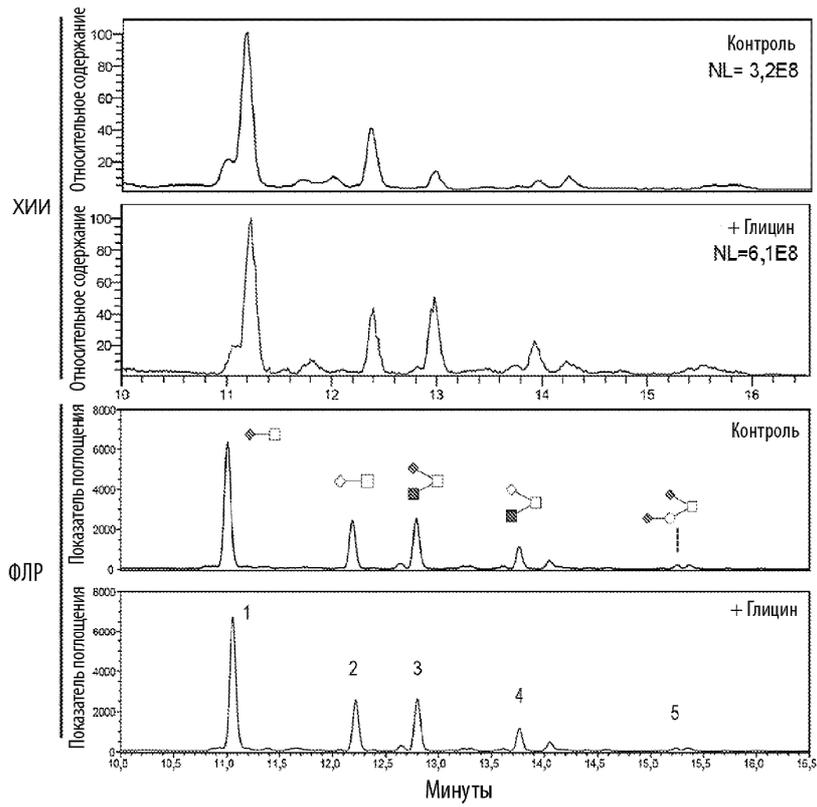
Фиг. 34



Фиг. 35



Фиг. 36



Фиг. 37А

Состав	Структура	Уровни относительно HexNAc1NeuAc1			
		ФЛР		МС	
		Контроль	Глицин	Контроль	Глицин
HexNAc1NeuAc1		100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
HexNAc1NeuGc1		34,9%	34,9%	36,4%	37,8%
HexNAc2NeuAc1		38,1%	38,1%	9,7%	36,0%
HexNAc2NeuGc1		17,0%	17,0%	3,5%	12,7%
Hex1HexNAc1NeuAc2		3,1%	3,1%	0,2%	2,1%

Фиг. 37В

ProCA отмеченные BSM 0-гликаны

Состав	Среднее состояние заряда		Общее усиление сигнала глицином
	Контроль	Глицин	
HexNAc	1,0	1,0	1,8
HexNAc2	1,0	1,0	3,2
HexNAc3	1,0	1,2	2,1
Hex1HexNAc1	1,0	1,0	3,7
HexNAc1NeuAc1	1,0	1,0	2,6
HexNAc1NeuGc1	1,0	1,0	2,7
HexNAc2NeuAc1	1,1	1,5	8,1
HexNAc2NeuGc1	1,1	1,5	9,0
Hex1HexNAc1NeuAc1	1,0	1,2	8,7
Hex1HexNAc1NeuAc1dHex1	1,1	1,6	8,8
Hex1HexNAc2NeuAc1	1,6	1,9	18,6
Hex1HexNAc2NeuGc1	1,6	1,9	21,7
Hex1HexNAc2NeuAc1dHex1	1,7	2,0	21,3
Hex1HexNAc2NeuGc1dHex1	1,7	2,0	23,7
Hex1HexNAc4dHex1	2,0	2,0	8,3
Hex3HexNAc4dHex1	2,0	2,0	14,0
Hex1HexNAc1NeuAc2	1,5	2,0	34,3
Hex1HexNAc1NeuAc1NeuGc1	1,2	2,0	156,5
Hex1HexNAc3NeuAc1	2,0	2,0	22,8
Hex1HexNAc3NeuAc1dHex	2,0	2,0	16,1
Hex1HexNAc2NeuAc1dHex2	1,7	2,0	30,5
Hex2HexNAc2NeuAc1dHex1	–	2,0	∞
Hex2HexNAc2NeuGc1	–	2,0	∞
Hex1HexNAc3Sulf1	1,0	1,4	6,3
Hex2HexNAc2Sulf1	1,0	1,1	4,0
Hex2HexNAc2dHex1Sulf1	1,0	1,2	4,6

N=3

Фиг. 38А

2AB отмеченные BSM 0-гликаны

Состав	Среднее состояние заряда		Общее усиление сигнала глицином
	Контроль	Глицин	
HexNAc2	1,0	1,0	2,7
HexNAc3	1,0	1,0	2,8
HexNAc1NeuAc1	1,0	1,0	2,2
HexNAc1NeuGc1	1,0	1,0	1,4
HexNAc2NeuAc1	1,0	1,0	1,3
HexNAc2NeuGc1	1,0	1,0	1,0

Фиг. 38В

Уменьшенные BSM 0-гликаны

Состав	Среднее состояние заряда		Общее усиление сигнала глицином
	Контроль	Глицин	
HexNAc	1,0	1,0	5,5
HexNAc2	1,0	1,0	5,5
HexNAc3	1,0	1,0	3,9
Hex1HexNAc1	1,0	1,0	12,2
HexNAc1NeuAc1	1,0	1,0	2,2
HexNAc1NeuGc1	1,0	1,0	2,6
HexNAc2NeuAc1	1,0	1,0	1,8
HexNAc2NeuGc1	1,0	1,0	1,7
Hex1HexNAc1NeuAc1	1,0	1,0	2,1
Hex1HexNAc1NeuAc1dHex1	1,0	1,0	1,7
Hex1HexNAc2NeuAc1	1,0	1,0	0,9
Hex1HexNAc2NeuGc1	1,0	1,0	1,4
Hex1HexNAc2NeuAc1dHex1	1,0	1,0	1,1
Hex1HexNAc2NeuGc1dHex1	1,0	1,0	0,2
Hex1HexNAc4dHex1	1,0	1,0	0,8
Hex3HexNAc4dHex1	1,0	1,0	0,3
Hex1HexNAc1NeuAc2	1,0	1,0	0,2
Hex1HexNAc1NeuAc1NeuGc1	1,0	1,0	0,1

N =3

Фиг. 38С

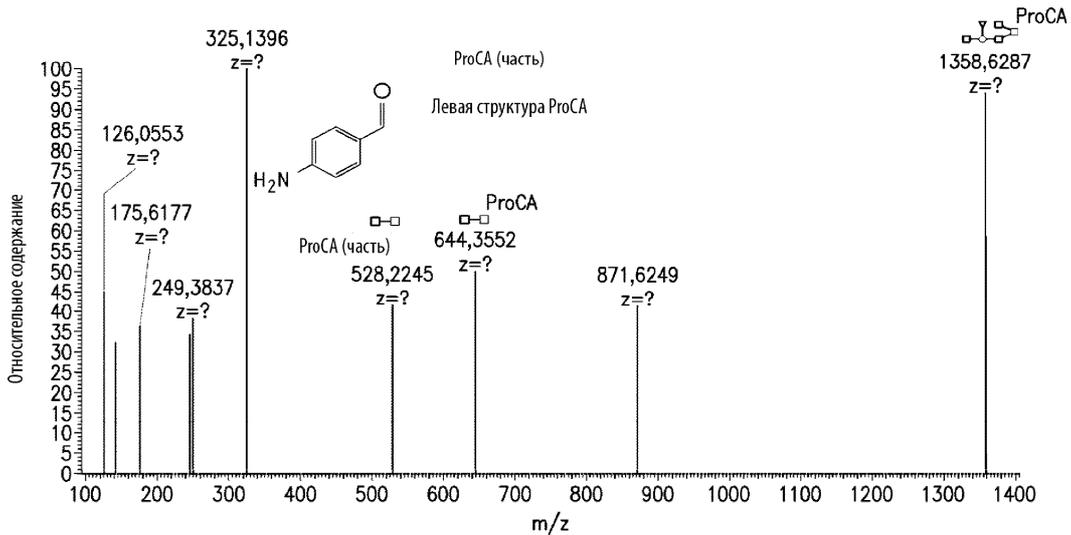
Система УПЛК		Waters Acquity UPLC 1-класса			
Мобильная фаза	А: 50 мМ формиат аммония, рН 4,4, с 1 мМ глицином или без него				
	Б: 15% 50 мМ формиат аммония, рН 4,4/85% ацетонитрил, с или без 1 мМ общей концентрации глицина				
Колонка	ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide, 130Å, 1,7 мкм, 2,1x150 мм, Waters (№ по каталогу: 186004742)				
Температура колонки	60°C ± 1°C				
Температура автосемплера	10°C ± 4°C				
Градиент	Время (мин)	% А	% В	Поток (мл/мин)	Изгиб
	исходный	0	100,0	0,45	Начальный
	5	0	100,0	0,45	Линейный
	20	29,5	70,5	0,45	Линейный
	23,5	100,0	0,0	0,2	Изократический
	26,5	100,0	0,0	0,2	Линейный
	30	0	100	0,2	Изократический
	33	0	100	0,45	Изократический
40	0	100	0,45	Изократический	
Длина волны детектора для меченых PROSA гликанов	Длина волны возбуждения при 310 нм и длина волны излучения при 370 нм Коэффициент усиления PMT установлен на 1,00				

Настройки MS Tune для анализа N-гликанов

- Полярность: положительная
- Напряжение распыления: 3,8 кВ
- Температура капилляра: 350°C
- Защитный газ: 40
- Вспомогательный газ: 10
- Температура нагревателя зонда: 250°C
- Уровень RF S-Lens: 50
- ион Источник: HESI
- Диапазон: от 220 до 1500 m/z

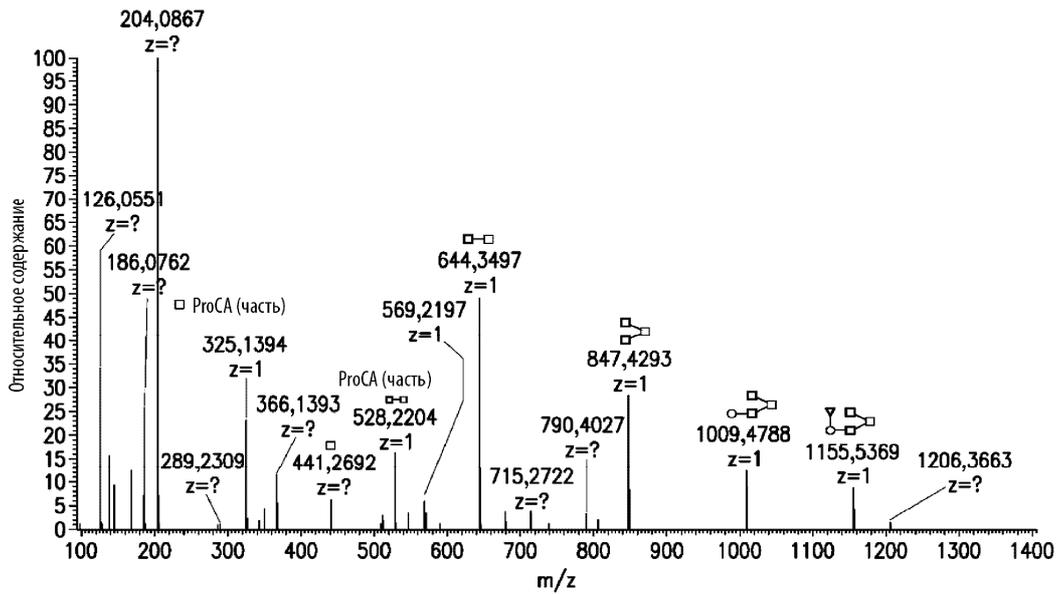
Фиг. 39

BSM_PGC-HILIC2_2ugOC #4962 RT: 16,40 AV: 1 NL: 1,02E4
 F: FTMS + p ESI d Full ms2 1358,6211@hcd22,00 [93,6667-1405,0000]

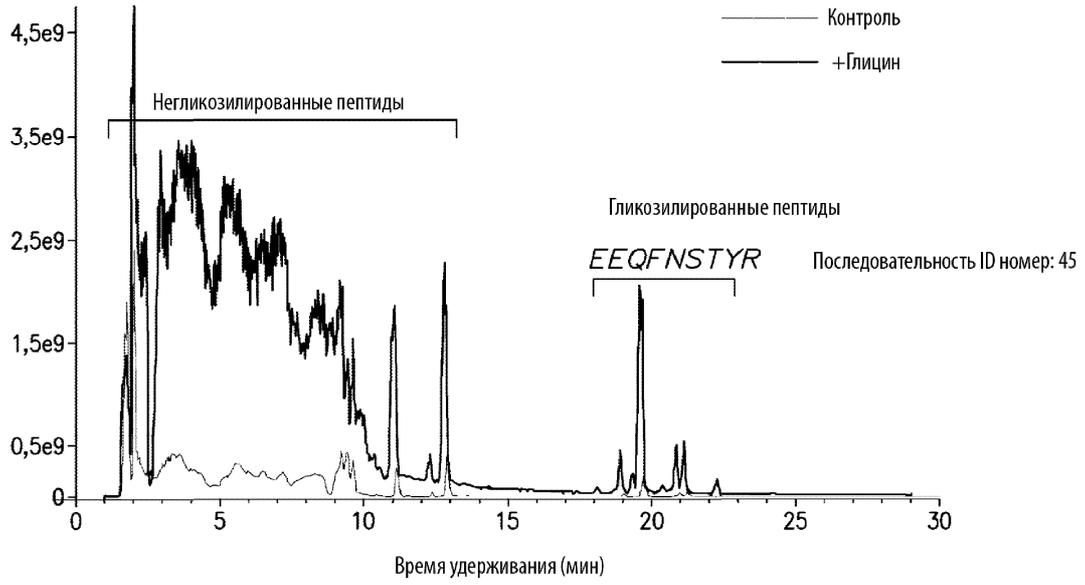


Фиг. 40

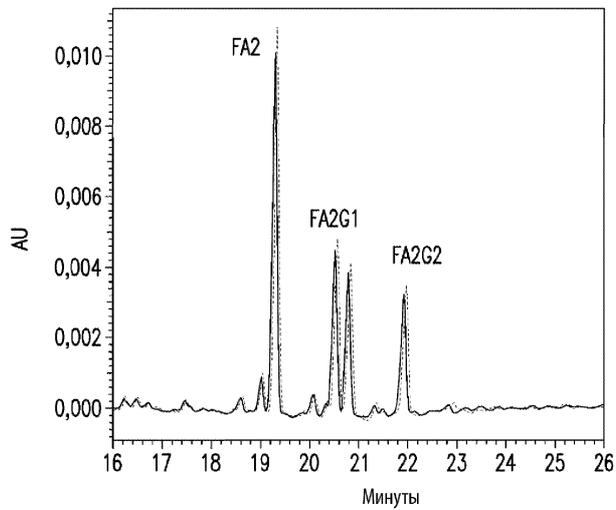
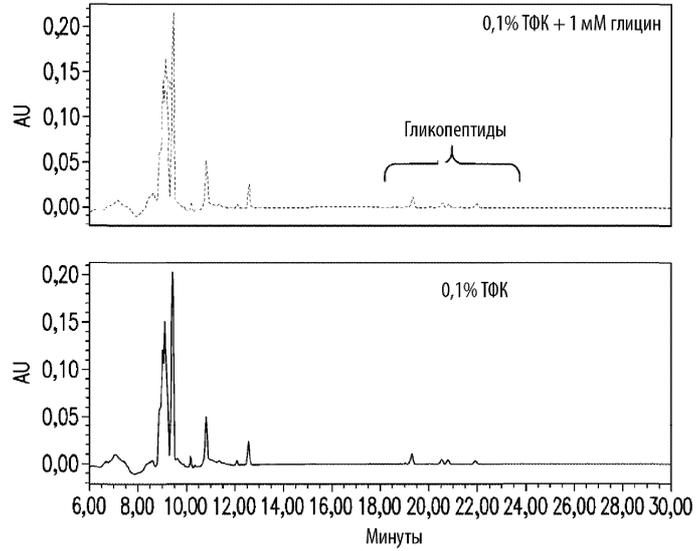
BSM-Glycan-ProCA-Sbio_1ugOC_Glycine #5339 RT: 15,87 AV: 1 NL: 9,45E4
 F: FTMS + p ESI d Full ms2 679.8138@hcd22,00 [93,6667-1405,0000]



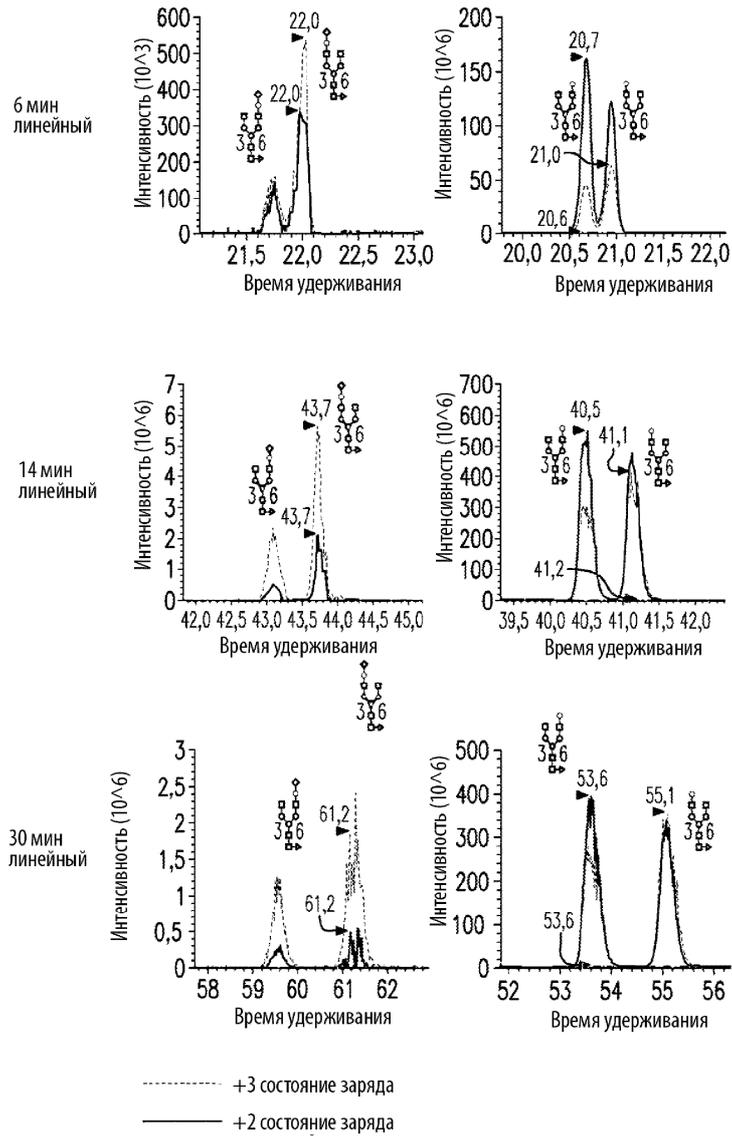
Фиг. 41



Фиг. 42А

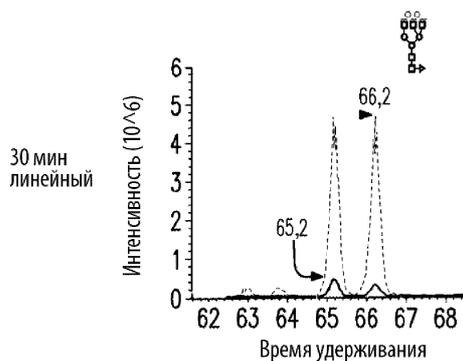
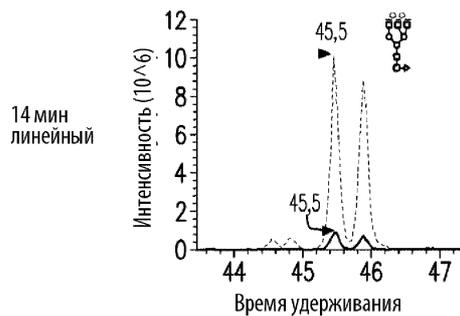


Фиг. 42В



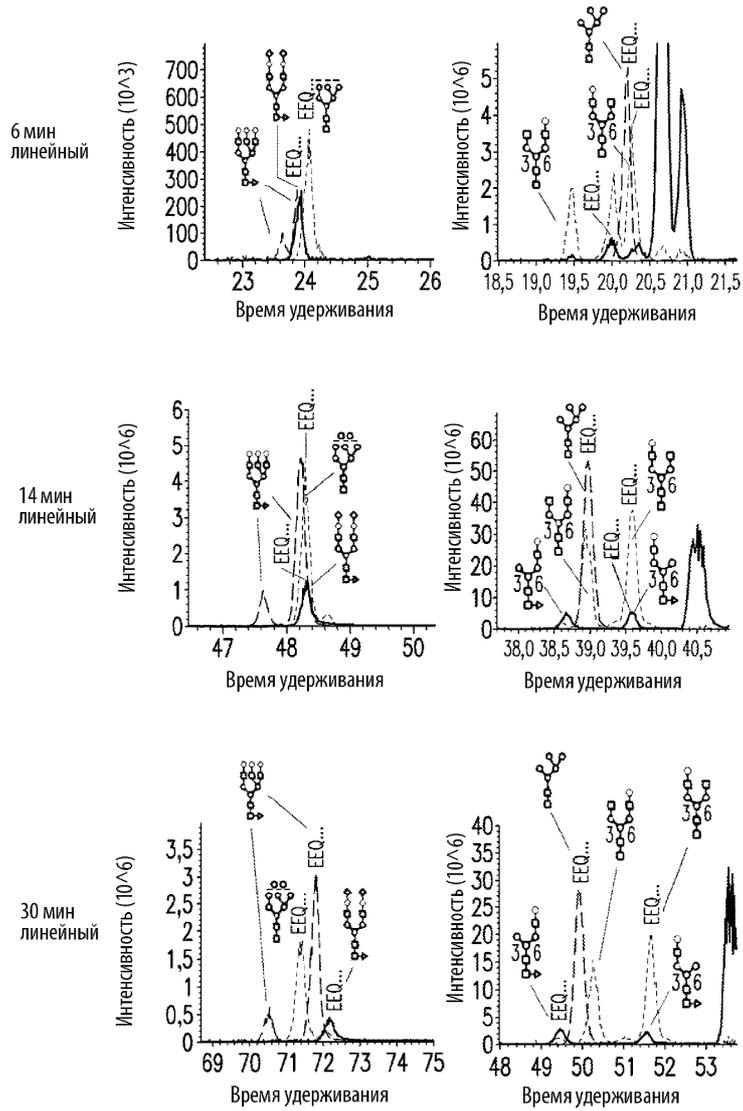
Фиг. 42С-1

047025

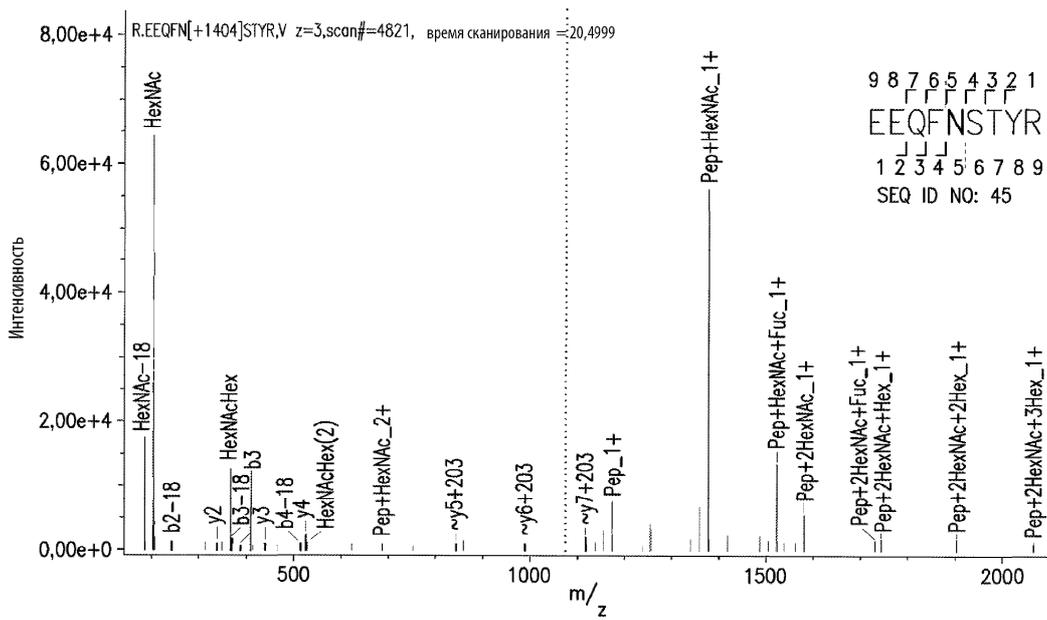


----- +3 состояние заряда
————— +2 состояние заряда

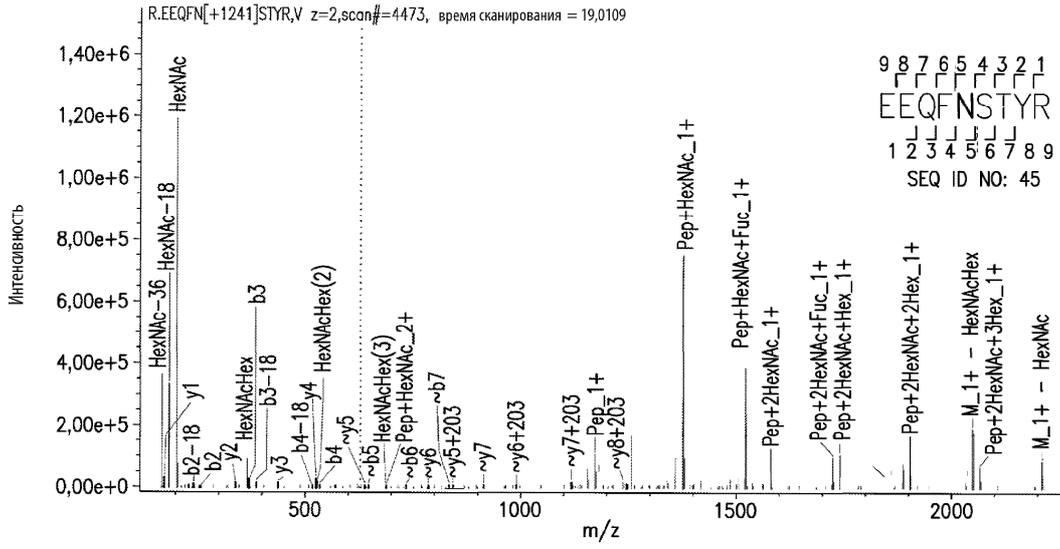
Фиг. 42С-2



Фиг. 42С-3

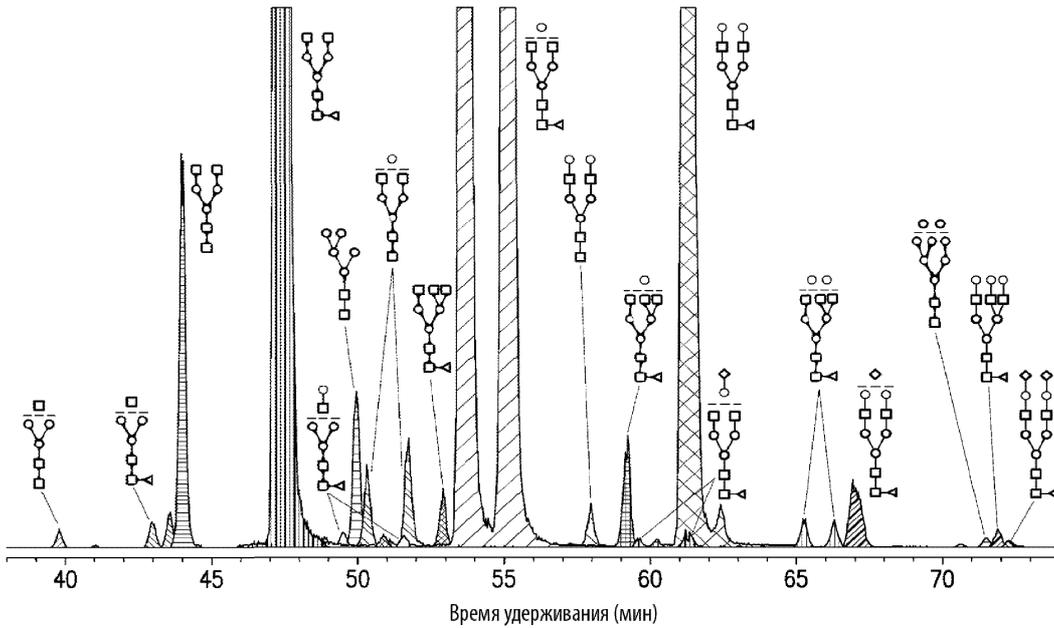


Фиг. 42D



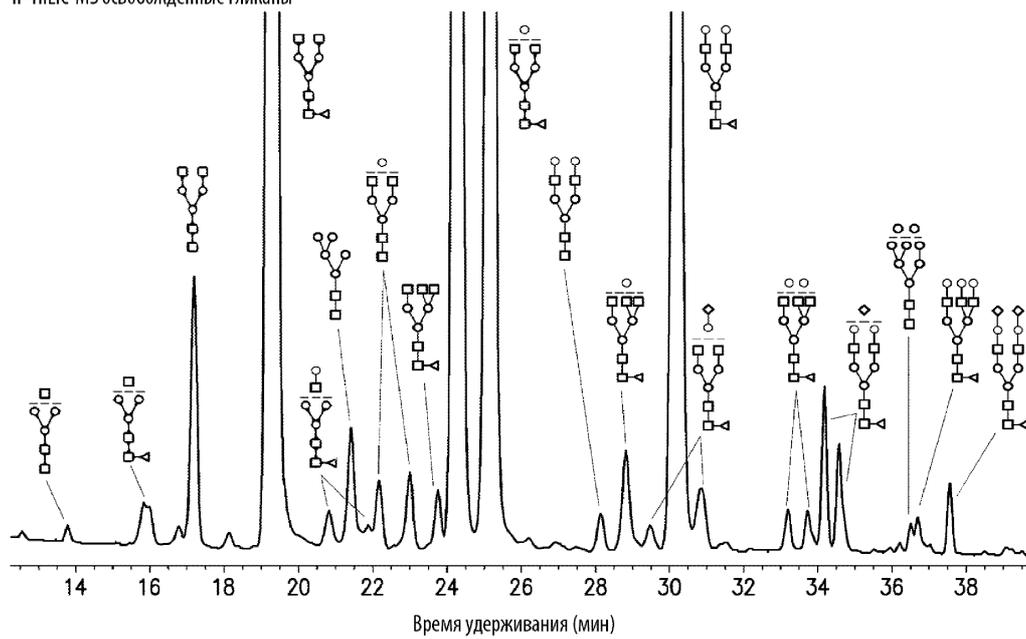
Фиг. 42E

IP-HILIC-MS гликопептиды

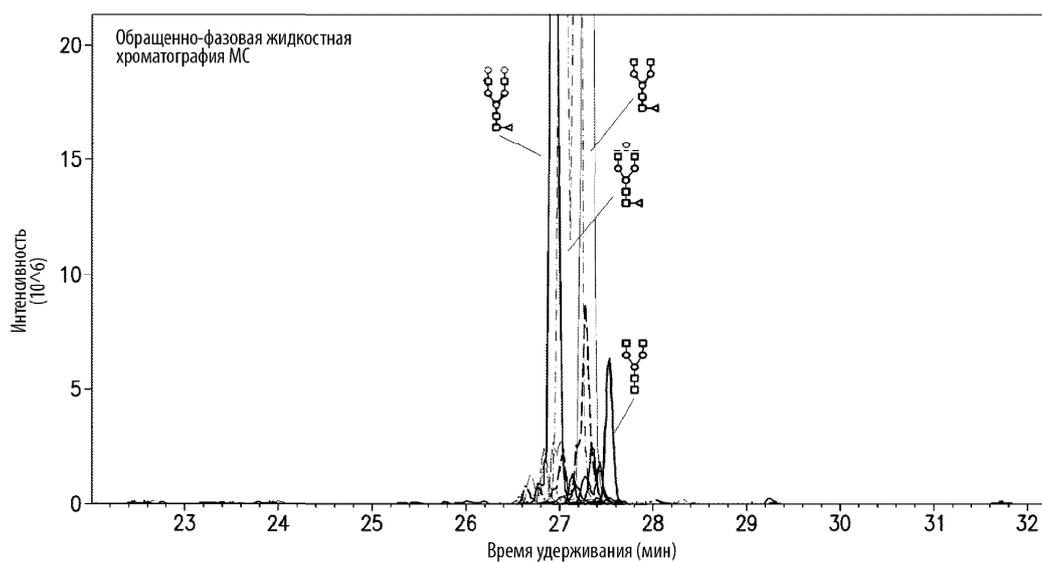


Фиг. 42F

IP-HILIC-MS освобожденные гликаны

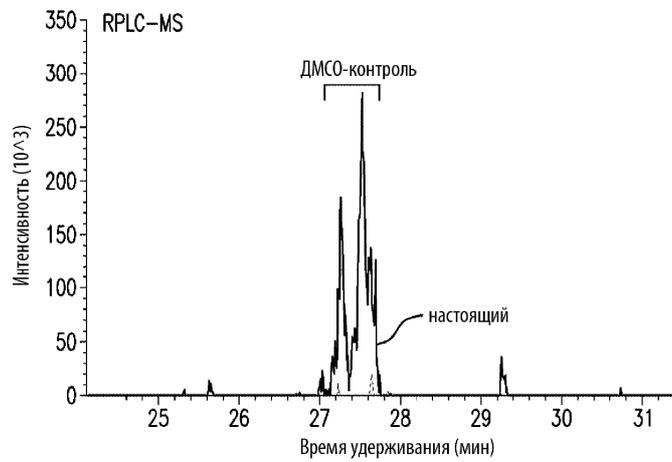
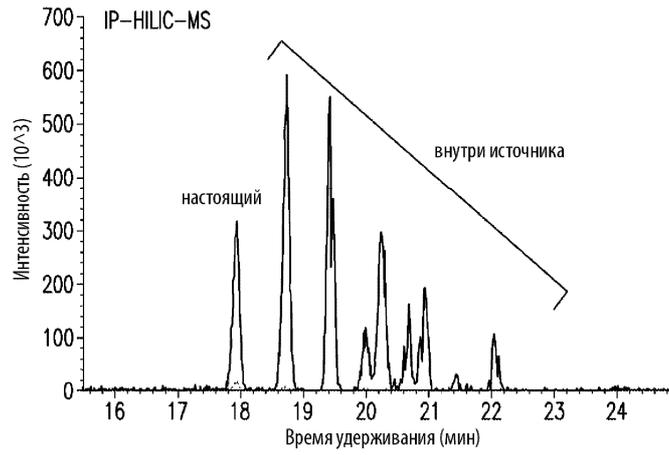


Фиг. 42G

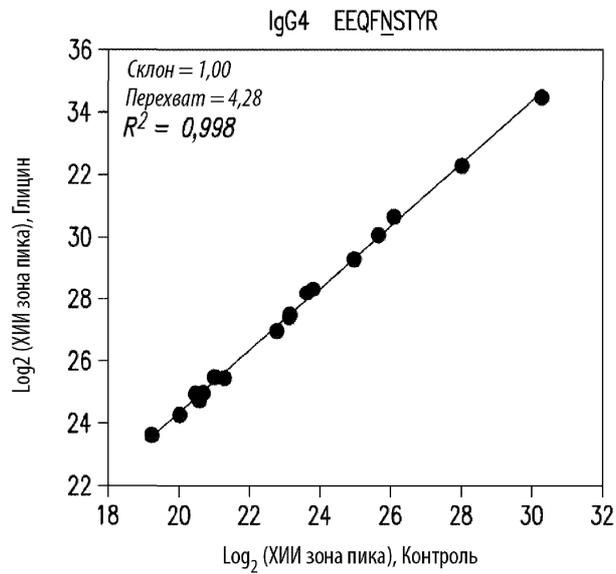


Фиг. 42H-1

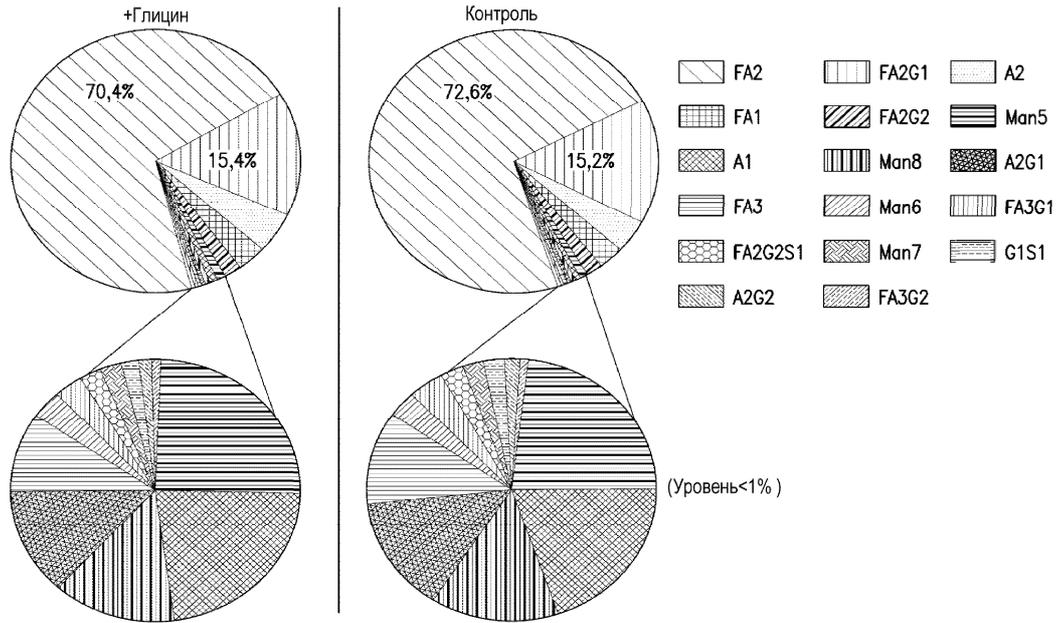
047025



Фиг. 42Н-2



Фиг. 43А

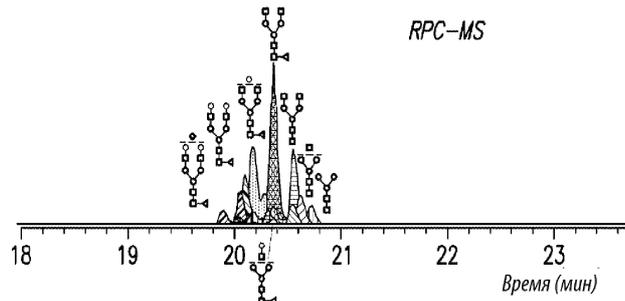
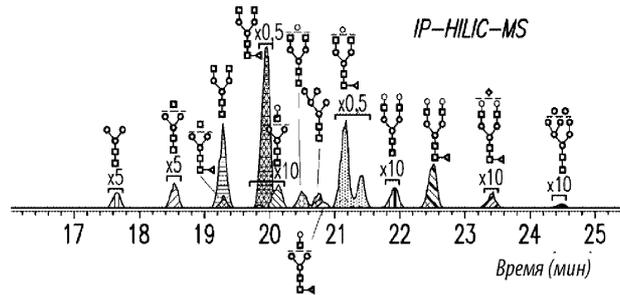
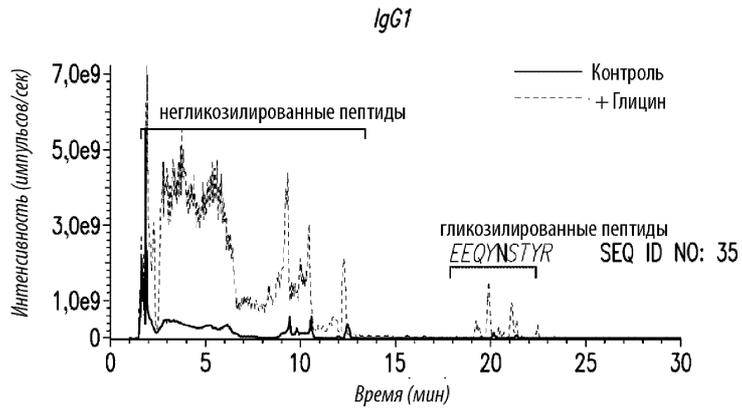


Фиг. 43В

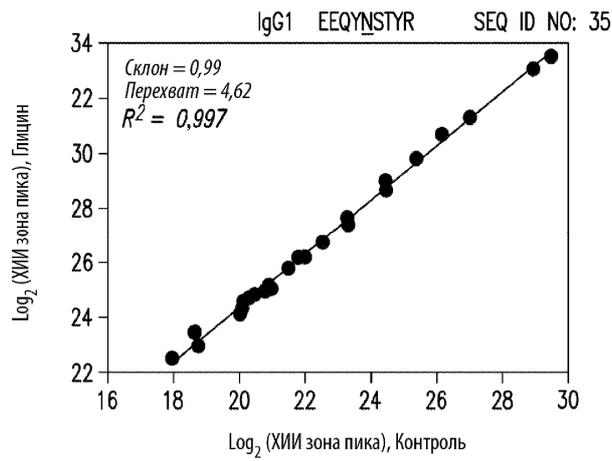
Название Гликана	0,1% ТФК + 1 мМ глицин				0,1% ТФК				Среднее изменение кратности
	Реплика 1		Реплика 2		Реплика 1		Реплика 2		
	Пиковая зона	Уровень	Пиковая зона	Уровень	Пиковая зона	Уровень	Пиковая зона	Уровень	
A1	1,8E+08	0,63%	1,8E+08	0,64%	9,0E+06	0,63%	1,2E+07	0,64%	17,6
A1G1	7,8E+07	0,27%	7,5E+07	0,26%	3,2E+06	0,23%	4,3E+06	0,24%	20,3
FA1	4,3E+08	1,47%	4,2E+08	1,47%	2,0E+07	1,44%	2,5E+07	1,41%	18,5
FA1G1	2,3E+08	0,78%	2,2E+08	0,76%	8,9E+06	0,62%	1,1E+07	0,63%	21,8
FA1G1S1	1,8E+07	0,06%	1,8E+07	0,06%	9,1E+05	0,06%	1,2E+06	0,07%	16,8
A2	2,7E+09	9,35%	2,6E+09	9,08%	1,2E+08	8,40%	1,5E+08	8,41%	19,5
A2G1	9,6E+08	3,29%	9,2E+08	3,21%	3,7E+07	2,62%	4,9E+07	2,74%	21,5
A2G2	7,8E+07	0,27%	7,6E+07	0,27%	3,6E+06	0,26%	4,7E+06	0,26%	18,6
FA2	1,3E+10	43,06%	1,2E+10	43,29%	6,7E+08	47,20%	8,2E+08	45,73%	16,6
FA2G1	9,1E+09	31,44%	9,0E+09	31,60%	4,4E+08	31,14%	5,8E+08	32,19%	17,7
FA2G2	1,8E+09	6,05%	1,7E+09	6,05%	6,6E+07	4,61%	8,7E+07	4,84%	22,7
FA2G2S1	6,1E+07	0,21%	5,7E+07	0,20%	2,5E+06	0,18%	3,5E+06	0,19%	19,5
A3	6,2E+06	0,02%	5,5E+06	0,02%	2,0E+05	0,01%	3,1E+05	0,02%	23,1
FA3	2,7E+07	0,09%	2,7E+07	0,09%	1,1E+06	0,08%	1,5E+06	0,08%	20,6
FA3G1	2,5E+07	0,09%	2,5E+07	0,09%	9,9E+05	0,07%	1,4E+06	0,08%	21,4
Man3	1,1E+08	0,39%	1,1E+08	0,39%	5,3E+06	0,37%	6,7E+06	0,37%	18,8
Man3F	8,5E+06	0,03%	8,0E+06	0,03%	3,7E+05	0,03%	5,0E+05	0,03%	18,9
Man4	1,1E+07	0,04%	1,1E+07	0,04%	2,8E+05	0,02%	5,4E+05	0,03%	27,0
Man4_A1G1	3,1E+07	0,11%	2,8E+07	0,10%	1,3E+06	0,09%	1,6E+06	0,09%	20,0
Man4_FA1G1	3,4E+07	0,12%	3,3E+07	0,11%	1,6E+06	0,11%	2,1E+06	0,12%	17,9
Man5	5,3E+08	1,82%	5,2E+08	1,83%	2,0E+07	1,42%	2,6E+07	1,44%	22,8
Man5_A1G1	2,1E+07	0,07%	2,0E+07	0,07%	9,3E+05	0,06%	1,3E+06	0,07%	18,8
Man6	3,9E+07	0,13%	3,8E+07	0,13%	1,7E+06	0,12%	2,2E+06	0,12%	19,3
Man7	2,8E+07	0,10%	2,7E+07	0,09%	1,1E+06	0,08%	1,5E+06	0,08%	20,9
Man8	3,6E+07	0,12%	3,3E+07	0,12%	1,8E+06	0,12%	2,3E+06	0,13%	16,9

Фиг. 43С

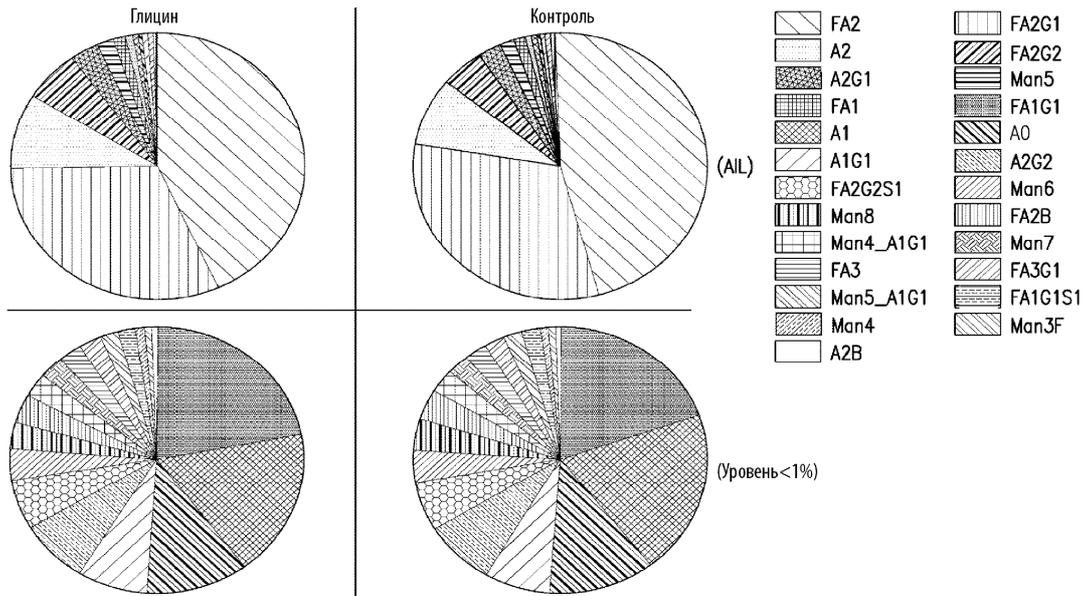
047025



Фиг. 43D-1



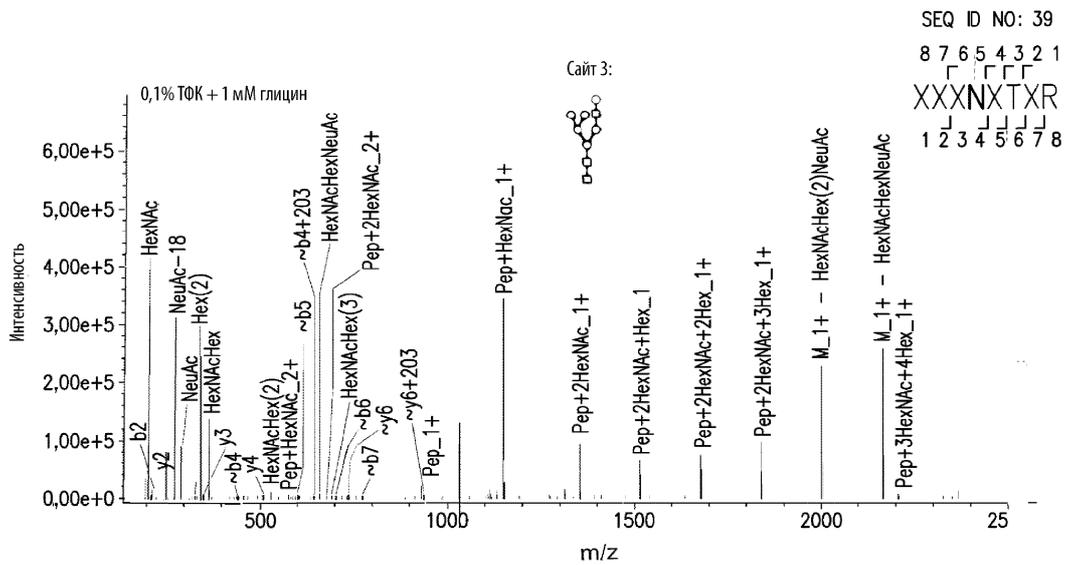
Фиг. 43D-2



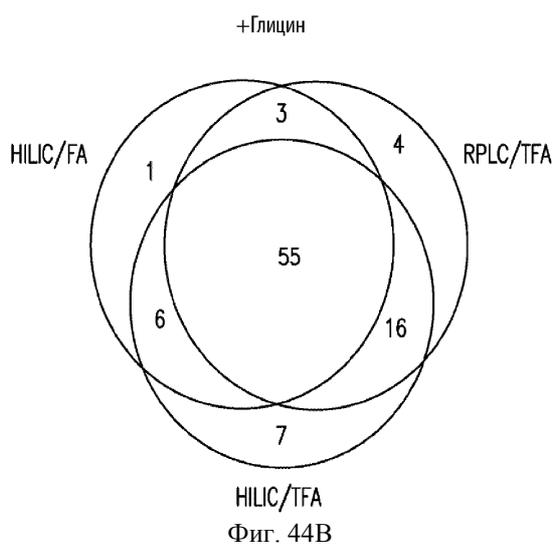
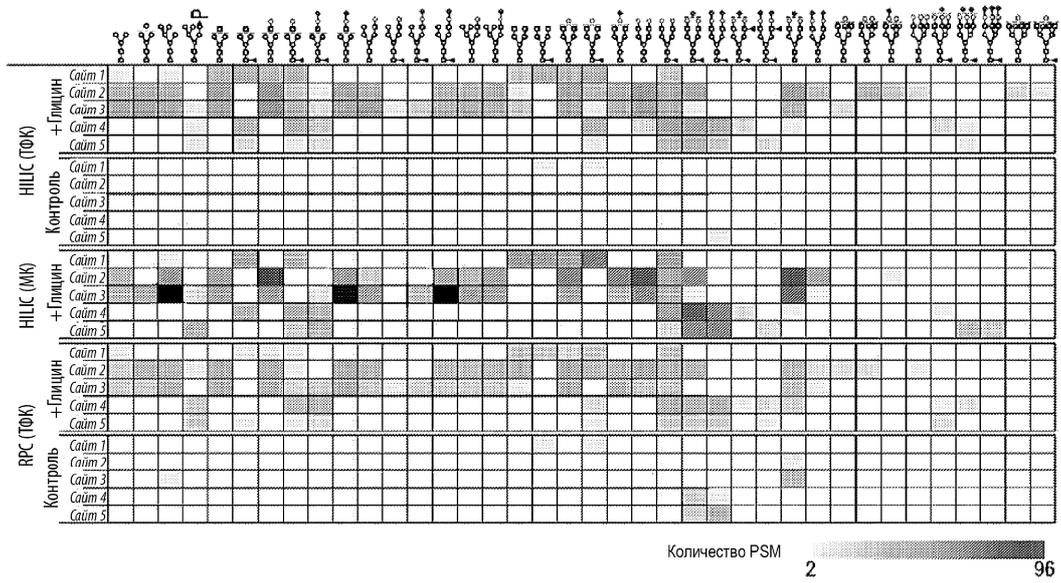
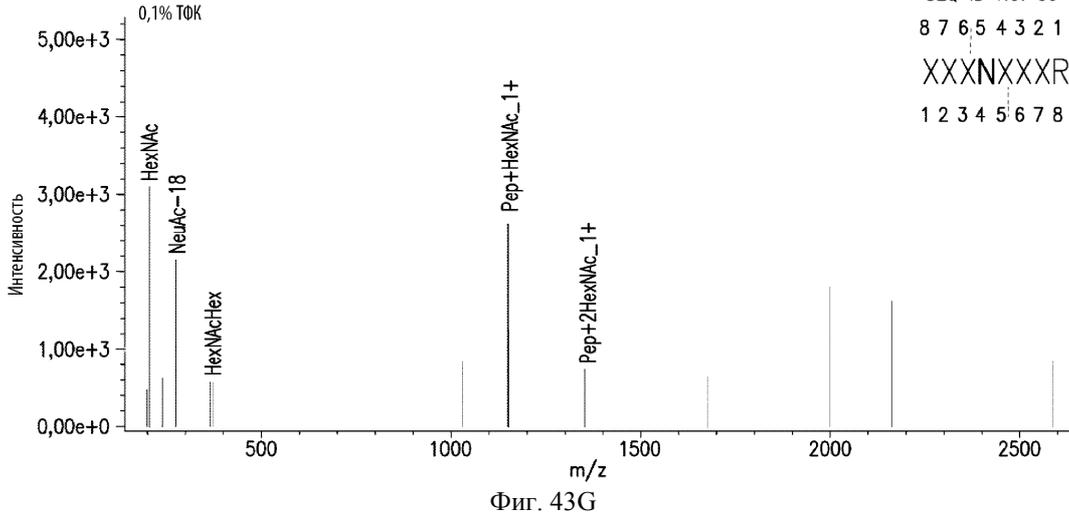
Фиг. 43D-3

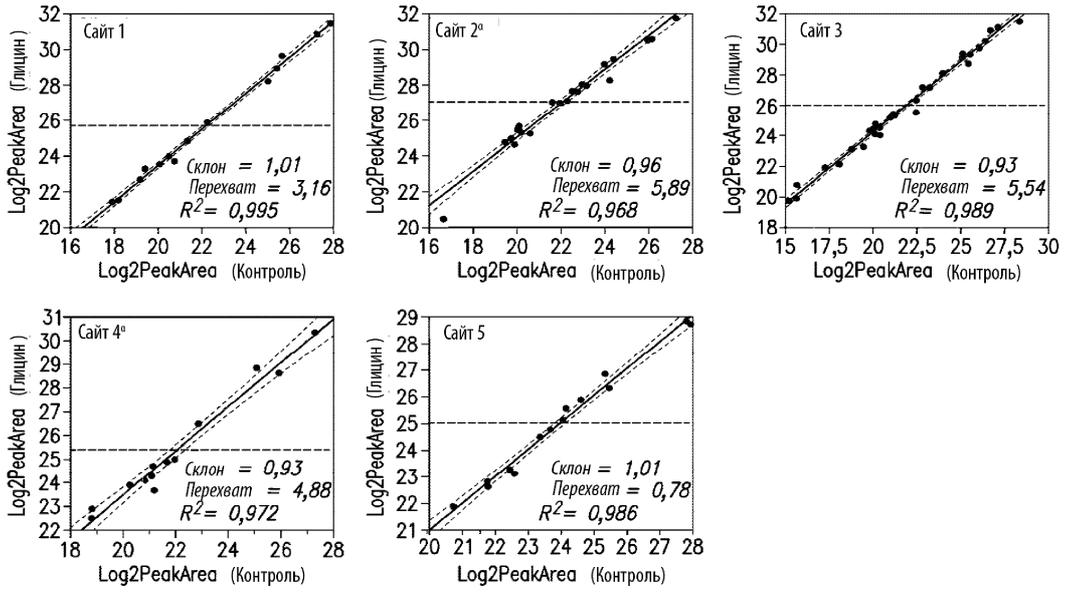
Название Гликана	0,1% ТФК + 1 мМ глицин				0,1% TFA				Среднее изменение кратности
	Реплика 1		Реплика 2		Реплика 1		Реплика 2		
	Пиковая зона	Уровень	Пиковая зона	Уровень	Пиковая зона	Уровень	Пиковая зона	Уровень	
A1	3,1E+08	0,91%	3,0E+08	0,88%	1,2E+07	0,70%	1,3E+07	0,72%	23,8
FA1	1,1E+09	3,33%	1,1E+09	3,28%	5,1E+07	2,87%	5,5E+07	2,97%	21,4
A2	1,7E+09	5,00%	1,7E+09	4,91%	7,2E+07	4,01%	7,2E+07	3,91%	23,7
A2G1	1,8E+08	0,51%	1,8E+08	0,52%	9,0E+06	0,50%	9,4E+06	0,51%	19,4
A2G2	2,0E+07	0,06%	1,9E+07	0,06%	1,0E+06	0,06%	1,1E+06	0,06%	18,8
FA2	2,4E+10	70,31%	2,4E+10	70,53%	1,3E+09	73,32%	1,3E+09	71,87%	18,4
FA2G1	5,3E+09	15,39%	5,3E+09	15,46%	2,6E+08	14,56%	2,9E+08	15,76%	19,2
FA2G1S1	2,9E+07	0,08%	2,6E+07	0,08%	1,5E+06	0,08%	1,6E+06	0,09%	17,7
FA2G2	6,8E+08	1,96%	6,5E+08	1,89%	3,1E+07	1,74%	3,5E+07	1,88%	20,1
FA2G2S1	3,3E+07	0,09%	3,2E+07	0,09%	1,7E+06	0,09%	1,7E+06	0,09%	19,4
FA2G2S2	4,4E+06	0,01%	4,4E+06	0,01%	6,8E+04	0,00%	8,9E+04	0,00%	55,9*
FA3	1,3E+08	0,38%	1,3E+08	0,38%	7,0E+06	0,39%	7,4E+06	0,40%	18,1
FA3G1	4,5E+07	0,13%	4,6E+07	0,13%	2,5E+06	0,14%	2,7E+06	0,14%	17,6
FA3G2	1,3E+07	0,04%	1,2E+07	0,03%	5,9E+05	0,03%	6,4E+05	0,03%	20,7
FA3G3	2,7E+06	0,01%	2,3E+06	0,01%	4,6E+04	0,00%	6,1E+04	0,00%	47,0*
Man5	3,4E+08	0,99%	3,3E+08	0,98%	1,4E+07	0,80%	1,5E+07	0,82%	22,9
Man6	4,6E+07	0,13%	4,7E+07	0,14%	2,0E+06	0,11%	2,2E+06	0,12%	22,1
Man7	3,2E+07	0,09%	3,2E+07	0,09%	1,4E+06	0,08%	1,5E+06	0,08%	22,1
Man8	1,9E+08	0,55%	1,8E+08	0,53%	8,9E+06	0,50%	9,6E+06	0,52%	20,1

Фиг. 43E

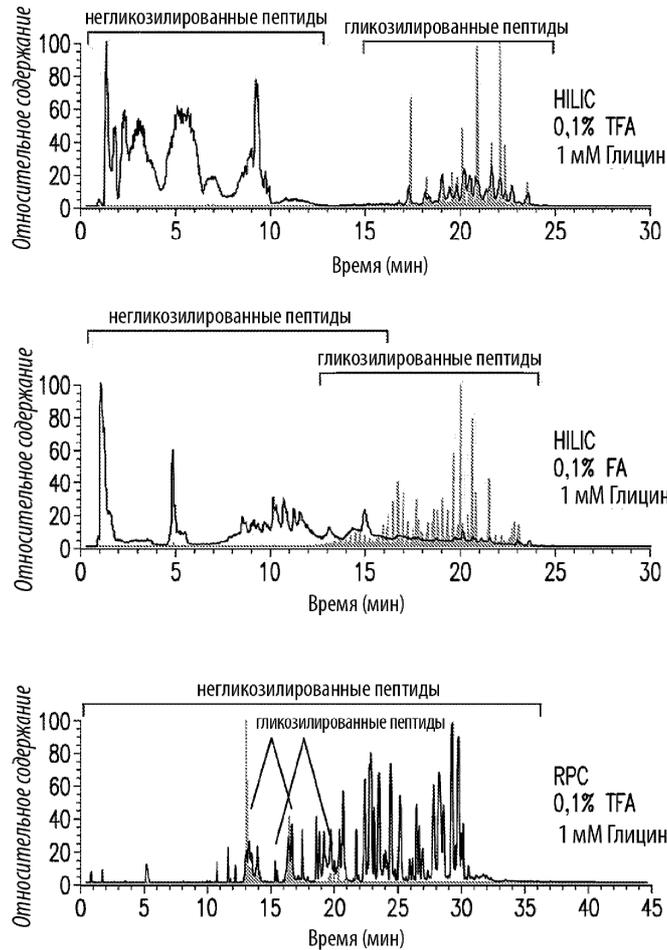


Фиг. 43F



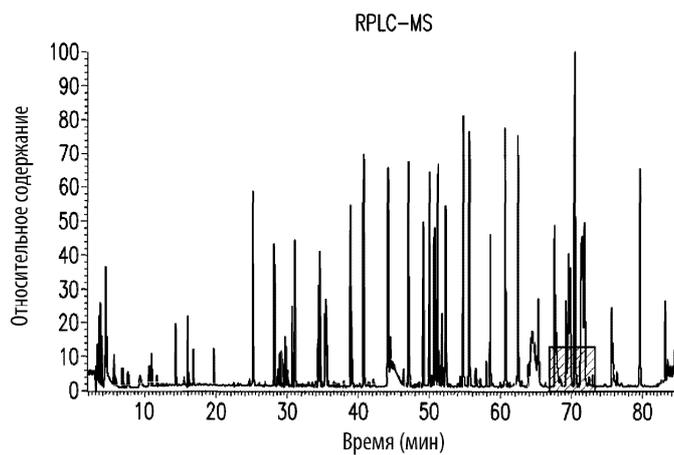


Фиг. 44С



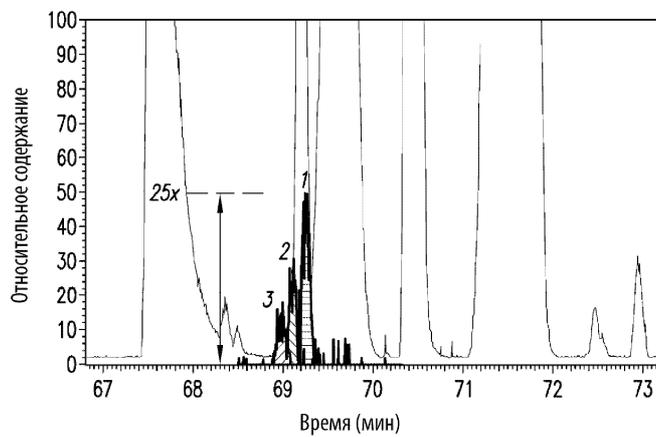
Фиг. 44D

047025

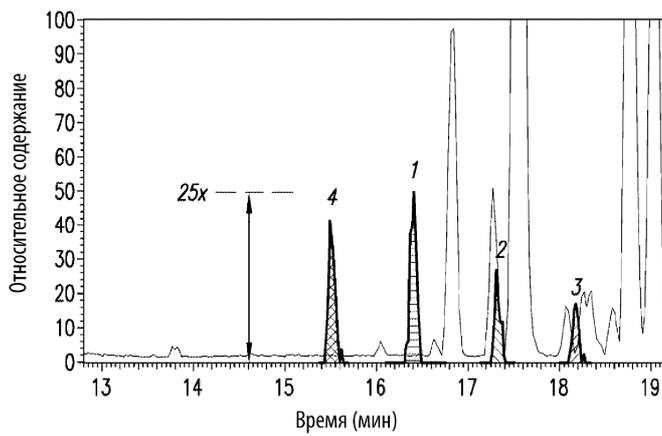


Фиг. 46А

Фиг. 46В



Фиг. 46С



Фиг. 46D

