

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047458**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.23(51) Int. Cl. **G01N 33/68 (2006.01)**(21) Номер заявки
202190263(22) Дата подачи заявки
2019.07.12**(54) ОБНАРУЖЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАННЫХ ПЕПТИДОВ**(31) **62/697,547**(32) **2018.07.13**(33) **US**(43) **2021.04.21**(86) **PCT/US2019/041541**(87) **WO 2020/014572 2020.01.16**(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**(72) Изобретатель:
Розенберг Эврахам З., Шэнь Бяо (US)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) AKIRA KONDO ET AL.: "Characterization of sialylated and fucosylated glycopeptides of [beta]2-glycoprotein I by a combination of HILIC LC and MALDI MS/MS", JOURNAL OF SEPARATION SCIENCE., vol. 33, no. 6-7, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 891-902, XP55624737, DE ISSN: 1615-9306, DOI: 10.1002/jssc.200900802, the whole document, In particular: Title; Abstract; Materials and methods; Scheme 1; Items 3.1 to 3.3.

GIUSEPPE PALMISANO ET AL.: "Selective enrichment of sialic acid-containing glycopeptides

using titanium dioxide chromatography with analysis by HILIC and mass spectrometry", NATURE PROTOCOLS, vol. 5, no. 12, 18 November 2010 (2010-11-18), pages 1974-1982, XP55624727, GB ISSN: 1754-2189, DOI: 10.1038/nprot.2010.167, the whole document, In particular: Title; Abstract; Figure 1.

MARTIN R. LARSEN ET AL.: "Characterization of Gel-separated Glycoproteins Using Two-step Proteolytic Digestion Combined with Sequential Microcolumns and Mass Spectrometry", MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 4, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 107-119, XP55624743, US, ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/mcp.M400068-MCP200, the whole document, In particular: Title; Abstract; Experimental procedures; Figure 1.

ALAGESAN KATHIRVEL ET AL.: "It is all about the solvent: on the importance of the mobile phase for ZIC-HILIC glycopeptide enrichment", ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, SPRINGER, DE, vol. 409, no. 2, 1 December 2016 (2016-12-01), pages 529-538, XP036122941, ISSN: 1618-2642, DOI: 10.1007/S00216-016-0051-6 [retrieved on 2016-12-01] the whole document, In particular: Title; Abstract; Materials and methods; Figure 1.

(57) Предложен способ очистки и/или разделения гликопептидов и их количественного определения. Способ включает приведение в контакт пробы, содержащей гликопептиды, с подложкой гидрофильного обогащения в условиях, которые позволяют гликопептидам связываться с подложкой гидрофильного обогащения. Гликопептиды элюируют из подложки гидрофильного обогащения раствором формиата аммония и ацетонитрила (ACN) в воде для получения обогащенной пробы гликопептидов, которую можно подвергать анализу для выявления конкретных гликопептидов.

B1**047458****047458 B1**

Область техники

Данное изобретение относится к биофармацевтическим веществам, а также к обнаружению и количественному определению *in vivo* пост-трансляционного гликозилирования белков, таких как терапевтические антитела и их фрагменты.

Уровень техники

Терапевтические моноклональные антитела (mAb) представляют собой гетерогенные молекулы, которые образуются в клетках млекопитающих, имеющие множество вариантов продуктов, в том числе варианты, полученные вследствие посттрансляционных модификаций (ПТМ). N-сцепленное гликозилирование является распространенной ПТМ в терапевтических антителах. Характеристика N-связанных гликановых структур и количественное определение отдельных гликоформ требуется регулирующими органами для определения качества лекарственного средства, демонстрации однородности характеристик от партии к партии и обеспечения контроля над производственным процессом. Как правило, N-связанные гликаны в антителах количественно определяют ферментативным отщеплением гликанов от антитела с последующим мечением флуоресцентными реагентами. В альтернативном варианте гликозилирование можно охарактеризовать на уровне пептида путем анализа гликопептидов, генерируемых расщеплением антитела трипсином. Однако гликопептиды, обладающие гетерогенными гликоформами, часто не разделяются хорошо обращенно-фазовой жидкостной хроматографией (ОФЖХ), которую как правило применяют для составления пептидных карт. Кроме того, фрагментация в источнике ионов сахарной цепи в гликопептидах, индуцированная масс-спектрометрией в режиме "онлайн" (МС), может вызывать артефакты усеченных гликоформ, которые нарушают точное количественное определение относительного содержания различных гликоформ с использованием МС.

Краткое описание сущности изобретения

В одном аспекте данное изобретение относится к способу очистки и/или разделения гликопептидов, включающий: (а) приведение в контакт пробы, содержащей гликопептиды, с подложкой гидрофильного обогащения в условиях, которые позволяют гликопептидам связываться с подложкой гидрофильного обогащения; (b) промывку подложки для гидрофильного обогащения для удаления негликопептидных примесей из подложки для гидрофильного обогащения; и (с) элюирование гликопептидов из подложки для гидрофильного обогащения водным раствором формиата аммония и ацетонитрила (АСN), тем самым создавая обогащенную пробу гликопептидов. Необязательно, способ включает нанесение обогащенной пробы гликопептидов на колонку для разделения и элюирование гликопептидов из колонки для разделения.

В некоторых вариантах реализации изобретения подложка гидрофильного обогащения включает подложку хроматографии для твердофазной экстракции (SPE).

В некоторых вариантах реализации изобретения подложка гидрофильного обогащения включает материал аминопропилового сорбента на основе силикагеля.

В некоторых вариантах реализации изобретения раствор формиата аммония и АСN в воде содержит около 100-400 мМ формиата аммония и от около 2,5% до около 10% АСN в воде.

В некоторых вариантах реализации изобретения раствор формиата аммония и АСN содержит 200 мМ формиата аммония и 5% АСN в воде.

В некоторых вариантах реализации изобретения подложку гидрофильного обогащения промывают раствором муравьиной кислоты и АСN для промывки, содержащим от 0,5% до около 5% муравьиной кислоты по объему и от около 85% до около 95% АСN по объему с остальной частью воды для удаления негликопептидных примесей.

В некоторых вариантах реализации изобретения раствор муравьиной кислоты и АСN для промывки содержит 1% муравьиной кислоты, 9% H₂O, 90% АСN по объему.

В некоторых вариантах реализации изобретения колонка для разделения включает колонку гидрофильного взаимодействия (HILIC).

В некоторых вариантах реализации изобретения элюирование гликопептидов из колонки для разделения дополнительно включает разделение гликопептидов на одну или более фракций.

В некоторых вариантах реализации изобретения разделение гликопептидов на одну или более фракций включает применение градиента подвижной фазы к колонке для разделения.

В некоторых вариантах реализации изобретения градиент подвижной фазы представляет собой от 10 мМ формиата аммония, рН 4,5 до 90% АСN с 10 мМ формиата аммония, рН 4,5.

В некоторых вариантах реализации изобретения градиент подвижной фазы представляет собой 0,05% ТФУ в H₂O или 0,045% ТФУ в АСN.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает определение гликопептидов, присутствующих в одной или более фракций.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает определение гликана, связанного с гликопептидами, присутствующими в одной или более фракций.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликан включает N-гликан.

В некоторых вариантах реализации изобретения гликопептиды получают из моноклонального антитела.

В некоторых вариантах реализации изобретения моноклональное антитело имеет изотип IgG1,

IgG2, IgG3, IgG4 или смешанный изотип.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает расщепление моноклонального антитела протеазой.

В некоторых вариантах реализации изобретения протеаза включает трипсин.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает проведение масс-спектрометрического анализа элюированных гликопептидов.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает профилирование гликозилирования на уровне элюированных гликопептидов.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает предварительную промывку подложки гидрофильного обогащения ацетонитрилом (ACN) в водном растворе.

В некоторых вариантах реализации изобретения способ дополнительно включает разбавление пробы, содержащей гликопептиды в растворе ACN в воде, перед приведением в контакт с подложкой гидрофильного обогащения.

Описание графических материалов

На фиг. 1 показана схематическая диаграмма рабочего процесса, иллюстрирующая существующие стандартные способы количественного определения гликопептидов с помощью жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ЖХ-МС).

На фиг. 2 показана таблица, иллюстрирующая результаты способа количественного определения гликопептидов, показанного в рабочем процессе на фиг. 1, по сравнению с количественным определением отщепленных гликанов; т.е. один на основе обнаружения гликопептидов, а другой на основе обнаружения отщепленного гликана.

На фиг. 3 показаны масс-спектры, демонстрирующие, что расхождения между количественным определением гликоформ способами определения гликопептидов и высвобожденных гликанов (см. фиг. 2) вероятно происходят из-за фрагментации в источнике ионов сахарного скелета в анализе МС гликопептидов, что вызывает увеличение сигналов артефактов усеченных гликанов (т.е. G0F-GlcNAc и G1F-GlcNAc) и уменьшение сигнала основного гликана (т.е. G0F и G1F). В способе определения высвобожденных гликанов гликоформы количественно определяют по флуоресценции метки, связанной с высвобожденным гликаном, а не по сигналу МС.

На фиг. 4 показана диаграмма рабочего процесса для способов количественного определения гликопептидов, как описано в данном документе.

На фиг. 5 показан набор хроматограмм HILIC-UV пептидов mAb1, отображающий результаты разделения пептидов mAb1, полученных расщеплением трипсином двумя различными методами.

На фиг. 6 показан крупный план гликопептидной части графика, показанного на фиг. 5, демонстрирующий, что метод № 2 имел лучшее разделение, более острые пики и большее отношение S/N.

На фиг. 7 показан набор хроматограмм HILIC-TIC гликопептидов mAb1 с крупным планом в области гликопептидов. Как показано, способ № 2 имел более высокое отношение S/N сигнала МС.

На фиг. 8А и 8В показаны спектры МС1 гликопептидов mAb1 (ионы M^{2+}).

На фиг. 9 показаны набор графиков и таблица, демонстрирующие сравнение количественного определения гликоформ путем разделения гликопептидов на колонке HILIC и путем анализа высвобожденных гликанов.

На фиг. 10 показаны набор графиков и таблица, демонстрирующие, что сушка расщепленных пептидов может помочь сконцентрировать гликопептиды но не влияет на сигнал УФ и относительное % содержание гликанов.

На фиг. 11 показан набор графиков, иллюстрирующий изменения для упрощения приготовления подвижной фазы и улучшения интегрирования пиков, сделанные путем использования 0,05% и 0,045% ТФУ в воде и в ACN, соответственно (подвижная фаза ОФ-ЖХ для составления пептидных карт).

На фиг. 12А, 12В, 12С и 12D показан набор результатов масс-спектров, демонстрирующий, что изменение подвижной фазы не имело влияния на сигнал МС гликопептидов (ионы M^{2+}).

На фиг. 13 показан набор графиков, демонстрирующий стабильность раствора гликопептидов mAb1, разбавленного до 80% ACN.

На фиг. 14 показан набор графиков, демонстрирующий, что пробы после расщепления трипсином имеют неправильно расщепленные гликопептиды, усложняющие количественное определение гликопептидов по УФ.

На фиг. 15 показаны набор графиков и таблица, демонстрирующие, что для нахождения процентного содержания неправильно расщепленных гликопептидов в каждом пике можно применять EIC наряду с данными масс-спектрометрии в режиме "онлайн" для облегчения количественного определения гликоформ.

На фиг. 16 показаны набор графиков и таблица, демонстрирующие, что повторное расщепление mAb2 трипсином приводило к удалению неправильно расщепленных гликопептидов для облегчения количественного определения гликоформ.

На фиг. 17 показан набор графиков, демонстрирующий, что формиат аммония значительно улучшил элюирование гликопептидов из HILIC SPE.

На фиг. 18 показаны набор графиков и таблица, демонстрирующие, что сушка или очистка

SPE/сушка не влияли на количественное определение гликопептидов mAb1.

На фиг. 19 показаны набор графиков и таблица, демонстрирующие подобные результаты количественного определения гликоформ mAb3 путем анализа гликопептидов и высвобожденных гликанов.

На фиг. 20А и 20В показаны набор графиков и таблица, демонстрирующие подобные результаты количественного определения гликоформ с использованием восстановленных и невосстановленных проб после расщепления mAb3 трипсином путем анализа гликопептидов и высвобожденных гликанов.

На фиг. 21 показан набор графиков, иллюстрирующий сравнение разделения гликопептидов IgG1 и IgG4, с и без фукозилирования.

На фиг. 22 показана схематическая диаграмма рабочего процесса, иллюстрирующая способы количественного определения гликопептидов, включающие способы, описанные в данном документе.

Подробное описание сущности изобретения

Перед описанием данного изобретения необходимо принять во внимание, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Следует также понимать, что терминологию, употребляемую в данном документе, применяют только для описания конкретных вариантов реализации изобретения и она не имеет ограничительного характера, поскольку объем данного изобретения ограничен только прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты реализации или признаки вариантов реализации могут сочетаться друг с другом, и такие комбинации непосредственно включены в объем данного изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое как правило подразумевается специалистом в области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Как используется в данном документе, термин "около", при использовании в отношении конкретного численного значения, означает, что значение может варьироваться от значения не более чем на 1%. Например, как используется в данном документе, выражение "около 100" включает 99 и 101 и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.п.).

Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать при практической реализации или испытании данного изобретения, далее будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, цитируемые в данном описании, включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Сокращения, используемые в данном документе:

ПТМ: пост-трансляционные модификации;

ОФ-ЖХ-МС/МС: обращенно-фазовая жидкостная хроматография в тандеме с масс-спектрометрией;

mAb: моноклональное антитело;

IgG: иммуноглобулин G;

LC: легкая цепь;

HC: тяжелая цепь;

МС: масс-спектрометрия;

SPE (Solid Phase Extraction): твердофазная экстракция;

HPLC: жидкостная хроматография гидрофильного взаимодействия;

УФ: ультрафиолетовое излучение;

ТФУ: трифторуксусная кислота;

ACN: ацетонитрил.

Определения

Как используется в данном документе, термин "антитело", предназначен для обозначения молекул иммуноглобулинов, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых цепей (H) и двух легких цепей (L), взаимосвязанных дисульфидными связями (т.е. "молекулы полных антител"), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи ("HCVR" или "V_H") и константной области тяжелой цепи (содержащей домены C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). В различных вариантах реализации изобретения тяжелая цепь может иметь изотип IgG. В некоторых случаях тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь имеет изотип IgG1 или IgG4, необязательно, включая химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи ("LCVR" или "V_L") и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L могут быть дополнительно поделены на области гиперварибельности, называемые определяющими комплементарностью областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу 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 антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, например, антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Для обзора структуры антител, см. Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) Dev. Comp. Immunol. 55-77 (2003); и M. Potter, *Structural correlates of immu-*

noglobulin diversity, 2(1) Surv. Immunol. Res. 27-42 (1983).

Термин антитело также включает "биспецифическое антитело", которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с несколькими отличающимися эпитопами. Одна половина биспецифического антитела, которая содержит одну тяжелую цепь, 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 связываться с тем же антигеном, но и на разных эпитопах или не перекрывающихся эпитопах. В некоторых случаях обе половины биспецифического антитела имеют одинаковые легкие цепи, при этом сохраняя двойную специфичность. Биспецифические антитела в целом описаны в публикации заявки на патент США № 2010/0331527 (30 Декабря 2010).

Как используется в данном документе, термин "антигенсвязывающая часть" антитела (или "фрагмент антитела") относится к одному или более фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с целевым антигеном.

Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, состоящий из двух фрагментов Fab, связанных дисульфидным мостиком 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), состоящий из домена VH; (vi) выделенную CDR; и (vii) scFv, состоящий из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием одной белковой цепи, в которой области VL и VH спариваются с образованием одновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также охвачены термином "антитело" (см. например, Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448; и Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

Кроме того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием стандартных способов рекомбинантной ДНК, как правило известных в данной области техники (см. Sambrook et al., 1989).

Термин "антитело человека" предназначено для включения антител, имеющих вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. mAb человека по данному изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Тем не менее, термин "человеческое антитело", как используется в данном документе, не предназначен для включения mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих (например, мыши), были привиты к последовательностям FR человека. Данный термин включает антитела, полученные рекомбинантными методами в организме млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Данный термин не предназначен для включения антител, выделенных или генерируемых в организме человека.

Как используется в данном документе, термин "гликопептид/гликопротеин" представляет собой модифицированный пептид/белок во время или после его синтеза ковалентно связанными углеводами или гликаном. В определенных вариантах реализации изобретения гликопептид получен из моноклонального антитела, например, из продукта расщепления протеазой моноклонального антитела.

Как используется в данном документе, термин "гликан" представляет собой соединение, содержащее один или более остатков сахаров, которые как правило включают глюкозу (Glc), галактозу (Gal), маннозу (Man), фукозу (Fuc), N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилнейраминовою 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 локализации в клетке. Например, специфическое моноклональное антитело модифицировано специфическим фрагментом гликана.

Термин "хроматография гидрофильного взаимодействия" или HILIC предназначен для включения процесса с использованием гидрофильной неподвижной фазы и гидрофобной органической подвижной фазы, в котором гидрофильные соединения удерживаются дольше, чем гидрофобные соединения. В определенных вариантах реализации изобретения в процессе используют подвижную фазу растворителя, смешивающегося с водой.

Как используется в данном документе, термин "проба" относится к смеси молекул, содержащей, по меньшей мере, молекулу аналита, например, гликопептида, такого как полученный из моноклонального антитела, которую подвергают манипуляциям в соответствии со способами по данному изобретению, включающим, например, разделение, анализ, экстракция, концентрирование или профилирование.

Как используется в данном документе, термины "анализ" или "анализирование" используются взаимозаменяемо и относятся к любому из различных методов разделения, обнаружения, выделения, очистки, растворения, обнаружения и/или характеристики молекул, представляющих интерес (например, гликопротеина). Примеры включают, но не ограничиваются ими, такие как твердофазная экстракция, твер-

дофазная микроэкстракция, электрофорез, масс-спектрометрия, например, SPE HILIC, MALDI-MS или ESI, жидкостная хроматография, например, высокоэффективная, например, обращенно-фазовая, нормально-фазовая или гель-фильтрация, ион-парная жидкостная хроматография, жидкофазная экстракция, например, ускоренная жидкостная экстракция, сверхкритическая флюидная экстракция, микроволновая экстракция, мембранная экстракция, экстракция в аппарате Сокслета, осаждение, осветление, электрохимическое обнаружение, окрашивание, элементный анализ, метод Эдмана, ядерный магнитный резонанс, инфракрасный анализ, проточно-инжекционный анализ, капиллярная электрохроматография, ультрафиолетовое обнаружение и их комбинации.

Как используется в данном документе, термин "профилирование" относится к любому из различных методов анализа, которые используют в комбинации для получения содержания, состава или характеристического соотношения гликопептидов в пробе.

Как используется в данном документе, "подложка гидрофильного обогащения" представляет собой хроматографический материал, который преимущественно связывает гидрофильные материалы в условиях, которые позволяют связывание, например, pH, ионная сила и т.д. В некоторых вариантах реализации изобретения подложку гидрофильного обогащения используют для SPE.

Как используется в данном документе, термин "хроматографическая поверхность" включает поверхность, которая подвергается воздействию пробы или аналитов. Хроматографическая поверхность может быть химически модифицирована, функционализирована или активирована или иметь микроструктуру, например, поры. В определенных вариантах реализации изобретения хроматографическая поверхность может являться гидрофобной, гидрофильной (полярной) или ионной. В других вариантах реализации изобретения хроматографическая поверхность является полностью пористой, поверхностно пористой или непористой.

Как используется в данном документе, термин "хроматографическое ядро" включает хроматографический материал, включающий, но не ограничиваясь им, органический материал, такой как силикагель, в виде частицы, монолита или другой пригодной структуры, которая образует внутреннюю часть материалов по данному изобретению. В определенных аспектах поверхность хроматографического ядра представляет собой хроматографическую поверхность или представляет собой материал, заключенный хроматографической поверхностью, как определено в данном документе. Материал хроматографической поверхности может быть распределен или связан или отожжен с хроматографическим ядром таким образом, что заметен дискретный или отчетливый переход или может быть связан с хроматографическим ядром таким образом, чтобы смешаться с поверхностью хроматографического ядра, что приводит к градиции материалов и отсутствию дискретной внутренней поверхности ядра. В определенных аспектах материал хроматографической поверхности может быть одинаковым или отличным от материала хроматографического ядра и может проявлять различные физические или физико-химические свойства от хроматографического ядра, включающие, но не ограничиваясь ими, такие как объем пор, площадь поверхности, средний диаметр пор, содержание углерода или гидролитическая стабильность pH.

Как используется в данном документе, термин "гидрофильный" описывает наличие аффинности, притяжения, адсорбции или абсорбции воды.

Как используется в данном документе, термин "гидрофобный" описывает отсутствие аффинности, отталкивание или неспособность адсорбировать или абсорбировать воду.

"Твердофазная экстракция" или "SPE" представляет собой хроматографическую методику, часто используемую в сочетании с количественным химическим анализом, например, высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) или газовой хроматографией (ГХ). Цель SPE состоит в том, чтобы изолировать целевые аналиты из сложной матрицы пробы, содержащей нежелательные примеси. Выделенные целевые аналиты выделяют в растворе, который является совместимым с количественным анализом. Данный конечный раствор, содержащий целевое соединение, можно непосредственно использовать для анализа или упаривать и повторно растворять в другом растворе меньшего объема с целью дальнейшего концентрирования целевого соединения, что делает его более пригодным для обнаружения и измерения.

Как используется в данном документе, "хроматография" относится к процессу разделения смеси, например смеси, содержащей гликопептиды. Она включает прохождение смеси через неподвижную фазу, которая отделяет молекулы, представляющие интерес, от других молекул в смеси и позволяет выделение одной или более молекул, представляющих интерес. Примеры методов хроматографического разделения включают, среди прочих, такие как хроматография капиллярного действия, такая как бумажная хроматография, тонкослойная хроматография (ТСХ), колоночная хроматография, жидкостная экспресс-хроматография белков (FPLC), нанопотоковая обращенно-фазовая жидкостная хроматография, ионообменная хроматография, гелевая хроматография, такая как гель-фильтрационная хроматография, эксклюзионная хроматография, аффинная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), жидкостная хроматография гидрофильного взаимодействия (HILIC) и обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ).

Как используется в данном документе, "приведение в контакт" включает объединение по меньшей мере двух веществ в растворе или на твердой фазе, например, приведение в контакт неподвижной фазы хроматографического материала с пробой.

Общее описание

Моноклональные антитела (mAb) возникли как эффективные биофармацевтические препараты против рака и других хронических заболеваний в связи с селективностью данных препаратов к целевым антигенам, например, путем активации иммунной системы для уничтожения опухолевых клеток, блокирования передачи сигнала пролиферации для опухолевых клеток, транспорта лекарственных средств в опухолевые клетки или как цели лучевой терапии. Гликозилирование иммуноглобулинов влияет как на их физико-химические свойства, так и на их клеточно-опосредованные эффекторные функции, такие как связывание и активация комплемента. Данные биологические функции могут зависеть не только от наличия или отсутствия N-связанных олигосахаридов, но также и от конкретной структуры олигосахаридов. Кроме того, N-гликозилирование антител как правило характеризуют в процессе производства биофармацевтических препаратов. В частности, профиль гликана моноклонального антитела иногда определяют как критический атрибут качества, поскольку он может являться мерой эффективности, иммуногенности и условий производства. Поэтому важно, чтобы подходы к анализу гликанов проявляли высокую чувствительность для облегчения детальной характеристики. При производстве терапевтических моноклональных антител, сайт-специфическое N-гликозилирование и оценка занятости сайта N-гликана являются важными. Таким образом, существует потребность в методах с высокой эффективностью/высокого разрешения для разделения гликопептидов, полученных из моноклональных антител. Описанное изобретение удовлетворяет данную необходимость.

В данном документе описан способ анализа и количественного определения гликопептидов, в котором твердофазная экстракция (SPE) спарена с жидкостной хроматографией гидрофильного взаимодействия (HILIC) для разделения гликозилированных и негликозилированных триптических пептидов. В различных вариантах реализации изобретения данные способы разделения спарены с ультрафиолетовой (УФ) детекцией и детекцией масс-спектрометрии в режиме "онлайн" (МС) для выяснения структур гликанов. В некоторых способах характеристика гликана опирается на высвобождение гликанов из пептидных цепей, а затем анализ их отдельно от пептидов (см., например, фиг. 1-3). Поскольку гликаны не подходят для детекции УФ, высвобожденные гликаны часто метят меткой флуорофора, например, антраниламида, антраниловой кислоты или 2-аминопиридина для детекции флуоресценции, или молекулой, например, прокаинамидом, со значительной основностью для обеспечения детекции МС. Однако данный подход к анализу гликанов дает только глобальную оценку гликозилирования. В частности, конкретная информация о сайте связывания гликанов теряется из-за того, что данный рабочий процесс основан на методике высвобождения. Напротив, в описанном способе выделенные гликопептиды разделяют на основе различий в структуре гликоформы в том же хроматографическом разделении. Кроме того, разделение гликопептидов с различными изомерами гликанов, которое было достигнуто с использованием колонки HILIC, не наблюдалось с использованием стандартных методов ОФ-ЖХ (см., например, фиг. 1-3). Путем оптимизации условий пробоподготовки для HILIC, включающих разбавление, вакуумную сушку и/или твердофазную экстракцию (SPE), был разработан рабочий процесс, который позволяет анализировать гликопептиды из различных типов пробоподготовки для составления пептидных карт (см., например, фиг. 22). Как описано в данном документе, авторы изобретения продемонстрировали, что способ и рабочий процесс пригодны для идентификации и количественного определения относительных уровней отдельных гликоформ в антителе на уровне пептида с использованием детекции УФ в сочетании с детекцией МС в режиме "онлайн" (см., например, фиг. 4 и 22).

Способы, описанные в данном документе, включают очистку и/или разделение и/или анализ гликопептидов, например, гликопептидов, полученных из моноклонального антитела, такого как антитело, которое было расщеплено одной или более протеаз. Описанные способы обеспечивают улучшенные результаты разделения и анализа и способность изучать гликаны, пока они все еще ковалентно связаны с их фрагментами антител. Данный анализ гликоформ на уровне пептида также обеспечивает преимущество в биофармацевтической характеристике в том, что одну пробу можно использовать для составления обращенно-фазовых пептидных карт, например, расщепление трипсином и составление пептидных карт гликопептида на основе HILIC. Кроме того, сохранение связи между гликаном и пептидом/белком облегчает детекцию УФ и МС на основе белкового компонента гликопептида, например, снимает необходимость мечения высвобожденных гликанов.

В определенных вариантах реализации изобретения способы включают приведение в контакт пробы, содержащей гликопептиды, с подложкой гидрофильного обогащения в условиях, которые позволяют и/или вызывают связывание гликопептидов с подложкой гидрофильного обогащения. После того, как пробу загружают на подложку гидрофильного обогащения, через нее можно пропускать серию оптимизированных растворов промывки и элюирования для отделения примесей из гликопептидов, а затем для сбора гликопептидов для дальнейшего анализа. В некоторых вариантах реализации изобретения подложку гидрофильного обогащения промывают для удаления негликопептидных примесей из пробы. Таким образом, гликопептиды обогащаются в значительной степени на подложке гидрофильного обогащения, например, на хроматографической поверхности подложки гидрофильного обогащения. В определенных вариантах реализации изобретения подложка гидрофильного обогащения включает материал аминопропилового сорбента на основе силикагеля. В определенных вариантах реализации изобретения подложка

гидрофильного обогащения настроена для твердофазной экстракции (SPE).

Устройства, предназначенные для SPE, как правило включают хроматографический сорбент (например, подложку гидрофильного обогащения, такую как аминопропиловый сорбент на основе силикагеля), который позволяет пользователю предпочтительно удерживать целевые компоненты, в данном случае, гликопептиды. Устройства SPE обычно включают резервуар, удерживающий пробу, средства для содержания сорбента и магистрали жидкости или носик для направления движения жидкостей, выходящих из устройства в пригодные контейнеры для сбора. Данное устройство SPE может быть в формате с одной ячейкой, что удобно и экономически эффективно для подготовки небольшого количества проб или в формате с множеством ячеек, который хорошо подходит для приготовления большого количества проб параллельно. Форматы с множеством ячеек как правило применяют в роботизированных системах дозирования жидкостей. Типичные форматы с множеством ячеек включают 48-, 96- и 384-луночные стандартные форматы планшетов. Жидкости как правило пропускают через устройство SPE и в контейнеры для сбора, либо путем приложения вакуума по всему устройству со специально разработанным вакуумным коллектором или путем приложения центробежной или гравитационной силы. Центробежную силу генерируют путем размещения устройства SPE вместе с пригодным лотком для сбора в центрифуге, специально предназначенной для предполагаемой цели. Для устройства SPE является предпочтительной высокая емкость для удержания целевых соединений широкого спектра хроматографических полярностей, для возможности поддержания удержания целевых соединений в то время, как примеси пробы вымывают в слив, и затем для обеспечения возможности элюировать целевые соединения в минимальном объеме элюирования, таким образом, максимально повысив степень концентрации целевого соединения, полученную во процессе SPE.

В соответствии с описанными способами можно применять разнообразные устройства твердофазной экстракции. В одном варианте реализации изобретения устройство SPE выбрано из группы, состоящей из пластин для микроэлюирования, хроматографических колонок, тонкослойных пластин, устройств очистки проб, картриджей для впрыскивания, микротитрационных планшетов и подготовительных устройств для хроматографии.

Материалы аминопропилового сорбента на основе силикагеля, включающие материалы для SPE, известны в данной области техники и могут быть получены коммерчески, например, от Waters Corporation, например, в форме пластины GlycoWorks HILIC SPE (см., например, патенты США № 6723236, 7052611 и 7192525). В некоторых вариантах реализации изобретения подложку гидрофильного обогащения подготавливают к добавлению пробы путем промывки, например, стадии предварительной промывки. В некоторых вариантах реализации изобретения подложку гидрофильного обогащения промывают до приведения в контакт с пробой гликопептидов. В некоторых вариантах реализации изобретения подложку гидрофильного обогащения промывают водой (H₂O) и/или раствором ACN (например, ACN в воде), таким как раствор от около 60% до около 95% ACN по объему, например, раствор около 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% ACN по объему с остальной частью воды.

В различных вариантах реализации изобретения подложку гидрофильного обогащения приводят в контакт с пробой, содержащей гликопептид, для обогащения. Что касается раствора пробы, он будет содержать гликопептиды, растворенные в растворителе, в котором гликопептиды являются растворимыми, и в котором гликопептиды будут связываться с подложкой гидрофильного обогащения. Предпочтительно, связывание является сильным, что приводит к связыванию значительной части гликопептидов. В некоторых случаях по существу все гликопептиды будут связаны. В различных вариантах реализации изобретения растворитель представляет собой водный раствор, как правило, содержащий буфер, соль и/или поверхностно-активные вещества для растворения и стабилизации гликопептидов. В некоторых вариантах реализации изобретения проба гликопептидов представляет собой раствор от около 60% ACN до 90% ACN и от 10% до около 40% воды с от около 0,1% до около 0,5% ТФУ по объему, такой как около 80:20 ACN:вода (об/об) с 0,2% ТФУ. Можно применять низкий pH для поддержания растворимости пептидов в растворителе с высоким содержанием органического растворителя, например, в растворе с pH менее, чем около 6,5, например, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 или 3,0.

Затем подложку гидрофильного обогащения промывают для удаления загрязнений, таких как негликозилированные пептиды, которые по существу не связываются с подложкой гидрофильного обогащения. Такие примеси могут быть удалены. В некоторых вариантах реализации изобретения подложку гидрофильного обогащения промывают раствором кислоты и ацетонитрила (ACN) в воде (H₂O), таком как раствор муравьиной кислоты и/или трифторуксусной кислоты (ТФУ) и ацетонитрила (ACN) в воде (H₂O). В определенных вариантах реализации изобретения раствор муравьиной кислоты и ACN содержит от около 0,5% до около 5% муравьиной кислоты по объему и от около 85% до около 95% ACN по объему с остальной частью воды, например, около 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% или 5,0% муравьиной кислоты по объему и около 80%, 85%, 90% или 95% ACN по объему. В определенных вариантах реализации изобретения раствор ТФУ и ACN содержит от около 0,5% до около 5% ТФУ по объему и от около 85% до около 95% ACN по объему с остальной частью воды, например, около 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% или 5,0% ТФУ по объему и около 80%, 85%, 90% или 95% ACN по объему. В определенном примере раствор для промывки представляет собой раствор

1% муравьиной кислоты, 9% H₂O, 90% ACN по объему. В определенном примере раствор для промывки представляет собой раствор 1% ТФУ, 9% H₂O, 90% ACN по объему.

Как только примеси были удалены, подложку гидрофильного обогащения приводят в контакт с раствором элюирования для элюирования гликопептидов из подложки гидрофильного обогащения. Аминопропиловый сорбент на основе силикагеля обладает слабоосновной поверхностью и имеет потенциал к анионному обмену. Однако относительное и полное извлечение гликопептидов из аминопропилового сорбента на основе силикагеля могут быть особенно чувствительны к условиям элюирования. Искаженное извлечение или распределение соединений могут быть проблематичными для методики пробоподготовки. В дополнение к отсутствию обеспечения точного отображения соединений, присутствующих в пробе, это может указывать на способ, который не является надежным, и полученные профили относительного содержания могут не определяться воспроизводимо, особенно в отношении наиболее плохо извлекающихся соединений. Например, для извлечения дериватизированных гликанов, в отличие от гликопептидов, которые являются объектом данного описания, рекомендуется использовать ацетат аммония в ACN в качестве раствора элюирования. Однако в случае гликопептидов ацетат аммония в ACN не дает хорошего результата. Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения гликопептиды элюируют из аминопропилового сорбента на основе силикагеля водным раствором формиата аммония и ACN. В некоторых вариантах реализации изобретения раствор формиата аммония и ACN в воде содержит около 100–400 мМ формиата аммония и от около 2,5 до около 10% ACN, например, около 100 мМ формиата аммония, около 150 мМ формиата аммония, около 200 мМ формиата аммония, около 250 мМ формиата аммония, около 300 мМ формиата аммония, около 350 мМ формиата аммония или около 400 мМ формиата аммония и около 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, 5,0%, 5,5%, 6,0%, 6,5%, 7,0%, 7,5%, 8,0%, 8,5%, 9,0%, 9,5% или 10,0% ACN. В определенном примере раствор формиата аммония и ACN в воде содержит около 200 мМ формиата аммония и около 5% ACN.

После того как гликопептиды проэлюировали из подложки гидрофильного обогащения, полученная обогащенная проба гликопептидов может быть подвергнута дальнейшему разделению и анализу, например хроматографией и/или анализом масс-спектрометрии. В вариантах реализации изобретения обогащенную пробу гликопептида наносят на колонку для разделения и впоследствии элюируют из колонки для разделения, например, с использованием градиента подвижной фазы для разрешения отдельных соединений гликопептидов.

В некоторых вариантах реализации изобретения градиенты растворителя, ступенчатые элюирования и/или многомерное элюирование выполняют для элюирования и/или разделения гликопептидов на колонке для разделения. Использование градиентов хорошо известно в области хроматографии. Основной принцип включает адсорбцию аналита на колонке для разделения, а затем элюирование градиентом растворителя десорбции. Градиент относится к изменению по меньшей мере одной характеристики растворителя, например, изменению pH, ионной силы, полярности или концентрации некоторых агентов, влияющих на силу взаимодействия связывания.

Используемые градиенты могут быть постепенными или могут быть добавлены ступенчато. В одном варианте реализации изобретения применяют два или более болюсов растворителя десорбции, варьирующихся в одном или нескольких измерениях. Например, два или более болюсов могут варьироваться в pH, ионной силе, гидрофобности или тому подобном. Раствор промывки, если используется, может быть выбран так, чтобы он удалял нежелательные примеси с минимальными потерями или повреждением связанных гликопептидов. Свойства раствора для промывки могут быть промежуточными между раствором пробы и раствором десорбции. Растворители, например, в градиенте элюирования, выбраны для совместимости с гликопептидами и методом детекции в конце. Как правило, используемые растворители представляют собой известные обычные растворители. В различных вариантах реализации изобретения растворители, из которых может быть выбран пригодный растворитель, включают такие как гидроксид аммония, триэтиламин, фосфат диаммония, метиленхлорид, ацетонитрил (с или без небольших количеств основных или кислотных модификаторов), метанол (содержащий большое количество модификатора, например уксусной кислоты или триэтиламина, или смеси воды с метанолом или ацетонитрилом), этилацетат, хлороформ, гексан, изопропанол, ацетон, щелочной буфер, буфер с высокой ионной силой, кислотный буфер, сильные кислоты, сильные основания, органические смеси с кислотами/основаниями, кислотный или основной метанол, тетрагидрофуран и вода.

Для анализа структур, таких как гликопептиды, может быть использована жидкостная хроматография, включающая ВЭЖХ. Для изучения данных структур можно применять различные формы жидкостной хроматографии, включающие анионообменную хроматографию, обращенно-фазовую ВЭЖХ, гелефильтрационную хроматографию, высокоэффективную анионообменную хроматографию и нормально-фазовую (НФ) хроматографию, включающую НФ-ВЭЖХ (см., например, Alpert et al., J. Chromatogr. A 676:191-202 (1994)). Хроматография гидрофильного взаимодействия (HILIC) представляет собой вариант НФ-ВЭЖХ, который может быть выполнен с частично водными подвижными фазами, что позволяет нормально-фазовое разделение пептидов, углеводов, нуклеиновых кислот и многих белков. Порядок элюирования для HILIC представляет собой от наименее полярного до наиболее полярного, противоположно тому, который для обращенно-фазовой ВЭЖХ. ВЭЖХ можно проводить, например, на системе

ВЭЖХ от Waters (например, Waters 2695 Alliance HPLC system), Agilent, Perkin Elmer, Gilson, и т.д.

НФ-ВЭЖХ, предпочтительно, HILIC, является особенно пригодной формой ВЭЖХ, которую можно использовать в способах, описанных в данном документе. В НФ-ВЭЖХ аналиты разделяют на основе полярных взаимодействий между аналитами и неподвижной фазой (например, подложкой). Полярный аналит связывается и удерживается полярной неподвижной фазой. Силы адсорбции увеличиваются с увеличением полярности аналита, и взаимодействие между полярным аналитом и полярной неподвижной фазой (относительно к подвижной фазе) увеличивает время элюирования. Использование более полярных растворителей в подвижной фазе уменьшит время удержания аналитов, в то время как более гидрофобные растворители, как правило, увеличивают время удержания.

Можно использовать различные типы подложек с НФ-ВЭЖХ, например, для колоночной хроматографии, включающие силикагелевые, аминные, амидные, целлюлозные, циклодекстриновые и полистирольные подложки. Примеры пригодных подложек, например, которые можно применять в колоночной хроматографии, включают: полисульфоэтил аспартамид (например, от PolyLC), сульфобетаиновую подложку, например, ZIC®-HILIC (например, от SeQuant), POROS® HS (например, от Applied Biosystems), POROS® S (например, от Applied Biosystems), полигидроэтил аспартамид (например, от PolyLC), Zorbax 300 SCX (например, от Agilent), PolyGLYCOPLEX® (например, от PolyLC), Amide-80 (например, от 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). Колонки, которые можно применять в описанных способах, включают колонки, которые используют одну или более из следующих функциональных групп: карбамоильные группы, сульфопропильные группы, сульфозэтильные группы (например, поли (2-сульфоэтил аспарамида)), гидроксизэтильные группы (например, поли (2-гидроксиэтил аспарамида)) и группы ароматических сульфоновых кислот.

Используемая подвижная фаза может содержать буферы с и без агентов для образования пары ионов, например, ацетонитрил и вода. Агенты для образования пары ионов включают формиат, ацетат, ТФУ и соли. Можно применять градиенты буферов, например, если применяют два буфера, концентрация или процентное содержание первого буфера может уменьшаться, в то время как концентрация или процентное содержание второго буфера увеличивается в течение прохода хроматографии. Например, процент 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%, 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 хроматографии. Например, процент первого буфера может увеличиваться от около 0%, около 1%, около 5%, около 10%, около 15%, около 20%, около 25%, около 30%, около 35%, 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 хроматографии. Необязательно, концентрация или процентное содержание первого и второго буфера могут возвращаться к исходным значениям в конце прохода хроматографии. В качестве примера, процентное содержание первого буфера может изменяться в пять этапов от 85% до 63%, до 59%, до 10%, до 85%; в то время как процентное содержание второго буфера на тех же этапах меняется с 15% до 37%, до 41%, до 90%, до 15%. Процентные содержания могут изменяться постепенно в виде линейного градиента или нелинейно (например, пошагово). Например, градиент может являться многофазным, например, двухфазным, трехфазным и т.д. В предпочтительных вариантах реализации изобретения в способах, описанных в данном документе, применяют градиент буфера с уменьшением ацетонитрила, который соответствует увеличению полярности подвижной фазы без использования агентов для образования пары ионов.

Температуру колонки можно поддерживать при постоянной температуре в течение всей хроматографии, например, с использованием коммерческого нагревателя колонки. В некоторых вариантах реализации изобретения колонку поддерживают при температуре от около 18°C до около 70°C, например, от около 30°C до около 60°C, от около 40°C до около 50°C, например, при около 20°C, около 25°C, около 30°C, около 35°C, около 40°C, около 45°C, около 50°C, около 55°C, около 60°C, около 65°C или около 70°C. Предпочтительная температура представляет собой около 45°C.

Скорость потока подвижной фазы может составлять от около 0 до около 100 мл/мин. Для аналитических целей скорость потока как правило находится в диапазоне от 0 до 10 мл/мин, для препаративной ВЭЖХ могут быть использованы скорости потока, превышающие 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 на имеющую одну и ту же упаковку, одинаковую длину, но меньший диаметр требует снижения скорости потока для сохранения одного и того же времени удержания и разрешения для пиков, как для колонки с большим диаметром. Предпочтительно, применяют скорость потока, эквивалентную около 1 мл/мин в колонке 4,6×100 мм, 5 мкм.

Время прогона 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 до около 120 мин, от около 50 до около 80 мин.

НФ-ВЭЖХ можно регулировать для выполнения в наномасштабе, например, с использованием ко-

лонок 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 определенных вариантах реализации изобретения колонка для разделения представляет собой колонку гидрофильного взаимодействия (HILIC) для разделения, и гликопептиды впоследствии элюируют из колонки HILIC для разделения, например, с использованием градиента подвижной фазы для разрешения отдельных соединений гликопептидов, тем самым очищая и разделяя гликопептиды в пробе. В некоторых примерах элюированные из HILIC гликопептиды разделяют на одну или более фракций. Такие фракции могут быть использованы для последующего анализа, такого как анализ МС. В определенных вариантах реализации изобретения способы включают определение гликопептидов и/или гликана, присутствующих в одной или более фракций. В определенных вариантах реализации изобретения гликан представляет собой N-гликан. В определенных вариантах реализации изобретения градиент подвижной фазы представляет собой от 10 mM формиата аммония, pH 4,5 до 90% ACN с 10 mM формиата аммония, pH 4,5. В определенных вариантах реализации изобретения градиент подвижной фазы представляет собой от 0,1% ТФУ в H₂O вплоть до 0,1% ТФУ в ACN.

Гликопептид получен из гликозилированного белка, такого как моноклональное антитело. Гликозилированное моноклональное антитело может быть получено путем восстановления, ферментативного расщепления, денатурации, фрагментации, химического расщепления и их комбинации. Способы, описанные в данном документе, применимы к любому изотипу антитела, например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанному изотипу.

Задача восстановления состоит в том, чтобы восстановить дисульфидные связи до двух тиолов в трехмерном белке, таком как моноклональное антитело. Восстановление можно выполнять путем тепловой денатурации, добавления поверхностно-активного вещества или добавления денатурирующего агента, например, гуанидин HCl (6M), в присутствии восстанавливающего агента, например TCEP-HCl. Ферментативная деградация представляет собой расщепление белка протеазой, например, трипсином или протеазой I *Achromobacter* (Lys-C). Кроме того, гликопротеин может быть денатурирован нагреванием, химическими веществами или их комбинацией. Фрагментация включает расщепление белковых частей одно- или мульти-субъединичного белка, такого как моноклональное антитело, физическими, биологическими или химическими методами. Например, для фрагментации субъединиц антитела как правило используют иммуноглобулин деградирующий фермент из *S. pyogenes* (IdeS).

В различных вариантах реализации изобретения антитело в пробе можно обрабатывать и подготавливать путем восстановления, ферментативной деградации, денатурации или фрагментации до приведения в контакт с подложкой гидрофильного обогащения. В способах предложен новый хроматографический метод для характеристики гликозилирования белков, например, препаратов моноклональных антител (mAb) с помощью фрагментирования и анализа HILIC-УФ-МС на уровне пептида. В определенных вариантах реализации изобретения пробы на любых промежуточных стадиях можно концентрировать, обессоливать или тому подобное.

В некоторых вариантах реализации изобретения способы дополнительно включают обнаружение гликопептида, например, с использованием УФ-сигнала пептидной части гликопептида. Это может быть проведено для фракций пробы и позволяет выбирать определенные фракции для дальнейшего анализа, например, анализа масс-спектрометрии (МС). Таким образом, в дополнительных вариантах реализации изобретения стадия обнаружения включает масс-спектрометрию или жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (ЖХ-МС). При применении масс-спектрометрии для анализа биомолекул молекулы переносят из жидкой или твердой фазы в газовую фазу и в вакуумную фазу. Поскольку многие биомолекулы являются как большими, так и легко разрушаемыми (белки являются главным примером), два из наиболее эффективных методов их переноса в вакуумную фазу представляют собой матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию (MALDI) или электрораспылительную ионизацию (ESI). Аспекты применения данных способов и требования к пробоподготовке, известны специалистам в данной области техники. В целом, ESI более чувствителен, а MALDI быстрее. Следует отметить, что некоторые пептиды ионизируются лучше в режиме MALDI, чем ESI, и наоборот (Genome Technology, June 220, p 52). Способы и устройства канала извлечения и устройства по данному изобретения особенно пригодны для пробоподготовки для анализа МС, особенно для проб биомолекул, таких как гликопептиды. Важным преимуществом данного изобретения является то, что оно позволяет получать обогащенную пробу, которую можно непосредственно анализировать без необходимости вмешательства стадий процесса, например, концентрирования или обессоливания.

ESI выполняют путем смешивания пробы с летучей кислотой и органическим растворителем и ее впрыск токопроводящей иглой, заряженной высоким напряжением. Заряженные капли, которые распыляются (или выходят) из кончика иглы, направляют в масс-спектрометр и высушивают нагреванием и вакуумом при пролете. После того, как капли высыхают, оставшиеся заряженные молекулы направляют электромагнитными линзами в масс-детектор и массу анализируют. В одном варианте реализации изобретения элюированную пробу наносят непосредственно из капилляра в форсунку для электрораспыления, например, капилляр выступает в качестве загрузчика пробы. В другом варианте реализации изобретения сам капилляр работает и как устройство экстракции, и как форсунка для электрораспыления.

В случае MALDI, молекулы аналита (например, белка) осаждают на металлических пластинах и сокристаллизуют с органической матрицей. Пробы сушат и вставляют в масс-спектрометр и как правило анализируют с помощью времяпролетной (TOF) детекции. В одном варианте реализации изобретения элюированную пробу наносят непосредственно из капилляра на металлическую пластину, например, сам капилляр выступает в качестве загрузчика пробы. В другом варианте реализации изобретения экстрагированный аналит осаждают на пластине для MALDI, добавляют матрицу для ионизации MALDI и пробу ионизируют и анализируют, например, путем детекции TOF.

В некоторых вариантах реализации изобретения применяют другие режимы ионизации, например ESI-МС, масс-спектрометрия с ионизацией турбораспылением, масс-спектрометрия с ионизацией нанораспылением, масс-спектрометрия с ионизацией термораспылением, масс-спектрометрия с ионизацией акустическим распылением, SELDI-МС и MALDI-МС. В целом, преимущество данных способов состоит в том, что они позволяют очистку пробы "точно вовремя" и непосредственное введение в ионизирующую среду. Важно отметить, что различные режимы ионизации и детекции вводят свои собственные ограничения на характер используемого раствора десорбции, и важно, чтобы раствор десорбции был совместимым с обоими. Например, матрица проб во многих приложениях должна иметь низкую ионную силу или находиться в пределах определенного диапазона рН и т.д. В ESI соль в пробе может помешать детекции путем снижения ионизации или забивая форсунку. Данную проблему решают путем введения аналита с низким содержанием соли и/или с использованием летучей соли. В случае MALDI аналит должен находиться в растворителе, совместимом с нанесением на пластину и с используемой матрицей ионизации.

Примеры

Следующие примеры приводятся с тем, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как получать и применять способы по данному изобретению, и они не предназначены для ограничения объема того, что заявители рассматривают как свое изобретение. Были предприняты меры для обеспечения точности в отношении используемых чисел (например, количества, температура, и т.д.) но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения должны быть учтены. Если не указано иное, части целого представляют собой массовые доли, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия, комнатная температура равна около 25°C, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1. Сравнение существующих способов на основе ОФЖХ-УФ-МС гликопептидов и высвобожденных гликанов.

Фиг. 1 представляет собой схематическую диаграмму рабочего процесса, иллюстрирующую существующие способы количественного определения гликопептидов. Терапевтическое антитело расщепляли трипсином после денатурации, восстановления и алкилирования. Относительное количественное определение проводили по интенсивности пиков (высоте) гликопептидов. В способе определения высвобожденных гликанов гликоформы количественно определяют по флуоресценции метки, связанной с высвобожденным гликаном, а не по сигналу МС. Фиг. 2 представляет собой таблицу, иллюстрирующую сравнение определения относительного количества каждой из гликоформ путем количественного определения отщепленных гликанов (меченных флуоресцентным реагентом, RapiFluor-MS от Waters) и количественного определения гликопептидов. Основные различия в количественном определении между способами показаны в рядах 3, 5, 7 и 8. Фиг. 3 представляет собой масс-спектры, демонстрирующие, что расхождения между количественным определением гликоформ способами определения гликопептидов и высвобожденных гликанов вероятно происходят из-за фрагментации в источнике ионов сахарного скелета в анализе МС гликопептидов, что вызывает увеличение сигналов артефактов усеченных гликанов (т.е. G0F-GlcNAc и G1F-GlcNAc) и уменьшение сигнала основного гликана (т.е. G0F и G1F). Данный результат демонстрирует, что для анализа гликанов на уровне пептида нужны новые и улучшенные способы.

Пример 2. Новые способы анализа гликопептидов с использованием HILIC-УФ-МС.

Пептиды из терапевтических антител были получены либо восстановительными, либо невосстановительными способами составления пептидных карт. Затем расщепленные пробы разбавляли до 80% ACN (об/об) перед анализом HILIC-УФ-МС.

Система ЖХ: Waters ACQUITY I-Class UPLC® с Детектором PDA (УФ) Система МС: Waters XEVO G2-S QToF или Thermo Scientific Q Exactive Plus.

Колонка: Waters ACQUITY UPLC® Glycan BEH Amide HILIC.

Фиг. 5 представляет собой набор хроматограмм HILIC-UV пептидов mAb1, отображающий результаты разделения пептидов mAb1, полученных расщеплением трипсином двумя различными методами. В способе № 1 используют формиат аммония, а в способе № 2 используют ТФУ. Относительные уровни различных гликоформ количественно определяли по УФ с использованием детектора PDA с детекцией МС в режиме "онлайн". Фиг. 6 представляет собой крупный план гликопептидной части графика, показанного на фиг. 5, демонстрирующий, что способ № 2 имел лучшее разделение, более острые пики и большее отношение S/N. Фиг. 7 представляет собой набор хроматограмм HILIC-TIC гликопептидов mAb1 с крупным планом в области гликопептидов. Как показано, метод № 2 имел более высокое отно-

шение S/N сигнала МС. Фиг. 8а и 8b представляют собой спектры МС1 гликопептидов mAb1 (ионы M^+). Фрагментация гликанов в источнике ионов МС не являлась фактором в количественном определении гликоформ по УФ. Фиг. 9 представляет собой набор графиков и таблицу, демонстрирующие сравнение разделения гликопептидов на колонке HILIC и анализ высвобожденных гликанов. Подобные результаты количественного определения гликоформ путем анализа гликопептидов и высвобожденных гликанов наблюдали для mAb1. Важно отметить, что никаких серьезных различий в результатах количественного определения гликоформ между данными двумя способами не наблюдали, что демонстрирует, что разделение на колонке HILIC является перспективным для анализа гликопептидов. Кроме того, общие уровни фукозилирования и галактозилирования были воспроизводимыми между двумя анализами. Артефакты усеченных гликанов не влияют на количественное определение гликопептидов по HILIC-УФ. Это предполагает, что артефакты, наблюдаемые в предшествующем анализе ОФЖХ, были связаны с фрагментацией в источнике ионов гликанов, вызванной МС.

Разбавленные пробы после расщепления могут быть концентрированы сушкой: если проба после расщепления имеет концентрацию $<0,5$ мг/мл, пробу можно концентрировать вакуумной сушкой и ресуспендированием высушенных пептидов в смеси 80:20 ACN:вода (об/об) с 0,2% ТФУ до 0,5 мг/мл или выше. Для поддержания растворимости пептидов в растворителе с высоким содержанием органического растворителя требуется низкий pH. Фиг. 10 представляет собой набор графиков и таблицу, демонстрирующие, что сушка пептидов помогала сконцентрировать пептиды и является воспроизводимой при использовании различных масс пробы (например, 5-20 мкг, слева сверху), но не влияла на сигнал УФ (слева снизу) и относительное % содержание гликанов (таблица справа). Фиг. 11 представляет собой набор графиков, демонстрирующий изменения для упрощения приготовления подвижной фазы и улучшения интегрирования пиков. Подвижную фазу изменяли от 0,1% ТФУ в смеси воды/ACN до таких же буферов подвижной фазы, используемых для составления пептидных карт (0,05% и 0,045% ТФУ в воде и ACN, соответственно). Фиг. 12A, 12B, 12C и 12D представляют собой набор результатов масс-спектров, демонстрирующий, что изменение подвижной фазы не имело влияния на сигнал МС гликопептидов (ионы M^{2+}). Фиг. 13 представляет собой набор графиков, демонстрирующий стабильность раствора гликопептидов mAb1, разбавленного до 80% ACN.

Идентификация неправильно расщепленных гликопептидов: фиг. 14 представляет собой набор графиков, демонстрирующий, что пробы после расщепления имеют неправильно расщепленные гликопептиды, усложняющие количественное определение гликопептидов по УФ. Фиг. 15 представляет собой набор графиков и таблицу, демонстрирующие, что для нахождения процентного содержания неправильно расщепленных гликопептидов в каждом пике можно применять экстракционную ионную хроматографию (EIC) наряду с данными масс-спектрометрии в режиме "онлайн". Для расчета соотношения неправильно расщепленного пептида(пептидов) и обычного триптического гликопептида(гликопептидов) в каждом совместно элюируемом пике и для отсеивания сигнала УФ неправильно расщепленного пептида для количественного определения гликоформ применяли EIC по данным детекции МС в режиме "онлайн". В альтернативном варианте, пробу после расщепления можно повторно расщеплять трипсином для преобразования неправильно расщепленных пептидов в обычные триптические гликопептиды.

Для повторного расщепления использовали следующий протокол: повышение pH пробы для расщепления до $\sim 8,0$ 3 M Tris base; добавление 1:5 E:S ratio (мас/мас) трипсина, инкубирование при 50°C в течение 1 ч; и добавление 0,2% ТФУ (конечный) и разбавление до 80% ACN (конечный) для анализа HILIC. Фиг. 16 представляет собой набор графиков и таблицу, демонстрирующие, что повторное расщепление mAb2 трипсином приводило к удалению помехи неправильно расщепленных гликопептидов для количественного определения гликоформ.

Загрязненные реагентами пробы после расщепления могут быть очищены твердофазной экстракцией и концентрированы сушкой: если проба после расщепления имеет концентрацию $<0,5$ мг/мл, ее можно концентрировать вакуумной сушкой и ресуспендированием высушенных пептидов в смеси 80:20 ACN:Вода (об/об) с 0,2% ТФУ до 0,5 мг/мл или выше. Для поддержания растворимости пептидов в растворителе с высоким содержанием органического растворителя требуется низкий pH.

Пробу после расщепления можно очистить от солей, реагентов или моющих средств твердофазной экстракцией (SPE), а затем высушить под вакуумом.

Пластина Waters GlycoWorks HILIC μ Elution (№ Кат. 186002780): промывка водой, затем смесью 80:15 ACN:Вода (об/об); добавление пробы пептида после расщепления (разбавленной до 80% ACN, об/об); промывка дважды смесью 1:9:90 муравьиная кислота/вода:ACN (об/об); элюирование раствором 200 mM формиата аммония, 5% ACN; вакуумная сушка элюированных гликопептидов; и ресуспендирование в смеси 80:20 ACN:Вода (об/об) с 0,2% ТФУ до 0,5 мг/мл.

Фиг. 17 представляет собой набор графиков, демонстрирующий, что формиат аммония значительно улучшает элюирование гликопептидов из HILIC SPE.

Фиг. 18 представляет собой набор графиков и таблицу, демонстрирующие, что сушка или очистка SPE/сушка не влияли на количественное определение гликопептидов mAb1.

Фиг. 19 представляет собой набор графиков и таблицу, демонстрирующие подобные результаты количественного определения гликоформ mAb3 путем анализа гликопептидов и высвобожденных гликанов.

Фиг. 20А и 20В представляют собой набор графиков и таблицу, демонстрирующие подобные результаты количественного определения гликоформ с использованием восстановленных и невосстановленных проб после расщепления mAb3 трипсином путем анализа гликопептидов и высвобожденных гликанов.

Фиг. 21 представляет собой набор графиков, демонстрирующий сравнение разделения гликопептидов IgG1 и IgG4, с и без фукозилирования.

Объем данного изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами реализации, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации данного изобретения в дополнение к описанным в данном документе будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеуказанного описания и сопроводительных фигур. Подразумевается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

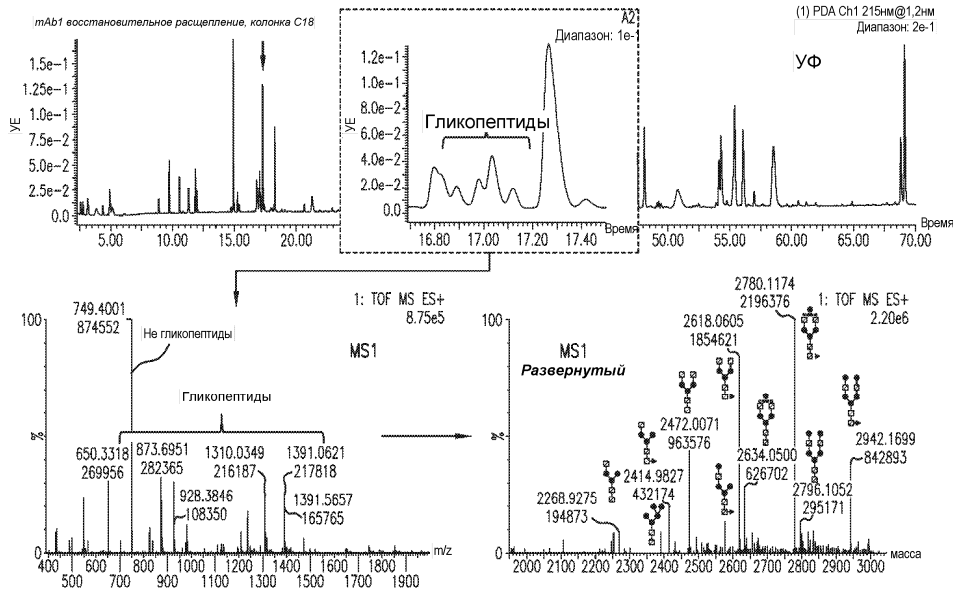
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ разделения гликопептидов, включающий
 - приведение в контакт пробы, содержащей гликопептиды, с подложкой гидрофильного обогащения в условиях, которые позволяют гликопептидам связываться с подложкой гидрофильного обогащения;
 - промывку подложки гидрофильного обогащения для удаления негликопептидных примесей из подложки гидрофильного обогащения;
 - элюирование гликопептидов из подложки гидрофильного обогащения водным раствором формиата аммония и ацетонитрила (ACN) для получения обогащенной пробы гликопептидов;
 - нанесение обогащенной пробы гликопептидов на колонку для разделения; и
 - элюирование гликопептидов из колонки для разделения, посредством чего происходит разделение гликопептидов в пробе.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что подложка гидрофильного обогащения включает подложку для хроматографии для твердофазной экстракции (SPE).
3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что подложка гидрофильного обогащения включает материал аминопропилового сорбента на основе силикагеля.
4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что раствор формиата аммония и ACN в воде содержит около 100-400 мМ формиата аммония и от около 2,5% до около 10% ACN в воде.
5. Способ по п.4, отличающийся тем, что раствор формиата аммония и ACN содержит около 200 мМ формиата аммония и около 5% ACN в воде.
6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что подложку гидрофильного обогащения промывают раствором муравьиной кислоты и ACN для промывки, содержащим от около 0,5% до около 5% муравьиной кислоты по объему и от около 85% до около 95% ACN по объему с остальной частью воды для удаления негликопептидных примесей.
7. Способ по п.6, отличающийся тем, что раствор муравьиной кислоты и ACN для промывки содержит около 1% муравьиной кислоты, около 9% H₂O и около 90% ACN по объему.
8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что колонка для разделения включает колонку гидрофильного взаимодействия (HILIC).
9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что элюирование гликопептидов из колонки для разделения дополнительно включает разделение гликопептидов на одну или более фракций.
10. Способ по п.9, отличающийся тем, что разделение гликопептидов на одну или более фракций включает применение градиента подвижной фазы к колонке для разделения.
11. Способ по п.10, отличающийся тем, что градиент подвижной фазы включает от около 10 мМ формиата аммония, pH 4,5, до около 90% ACN с 10 мМ формиата аммония, pH 4,5.
12. Способ по п.10, отличающийся тем, что градиент подвижной фазы включает около 0,05% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в H₂O или около 0,045% ТФУ в ACN.
13. Способ по любому из пп.9-12, дополнительно включающий определение гликопептидов, присутствующих в одной или более фракций.
14. Способ по любому из пп.9-13, дополнительно включающий определение гликана, связанного с гликопептидами, присутствующими в одной или более фракций.
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что гликан включает N-гликан.
16. Способ по любому из пп.9-15, отличающийся тем, что гликопептиды получены из моноклонального антитела.
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что моноклональное антитело имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанный изотип.
18. Способ по п.16 или 17, дополнительно включающий расщепление моноклонального антитела протеазой.
19. Способ по п.18, отличающийся тем, что протеаза включает трипсин.
20. Способ по любому из пп.1-19, дополнительно включающий проведение масс-спектрометрического анализа элюированных гликопептидов.

21. Способ по любому из пп.1-20, дополнительно включающий профилирование гликозилирования на уровне элюированных гликопептидов.

22. Способ по любому из пп.1-21, дополнительно включающий предварительную промывку подложки гидрофильного обогащения раствором ацетонитрила (ACN) в воде.

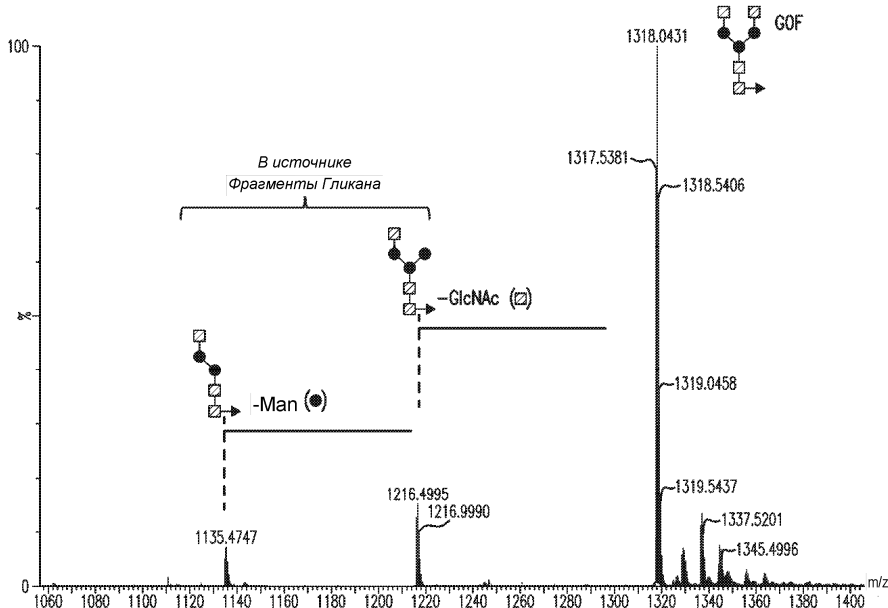
23. Способ по любому из пп.1-22, дополнительно включающий разбавление пробы, содержащей гликопептиды в растворе ACN в воде, перед приведением в контакт с подложкой гидрофильного обогащения.



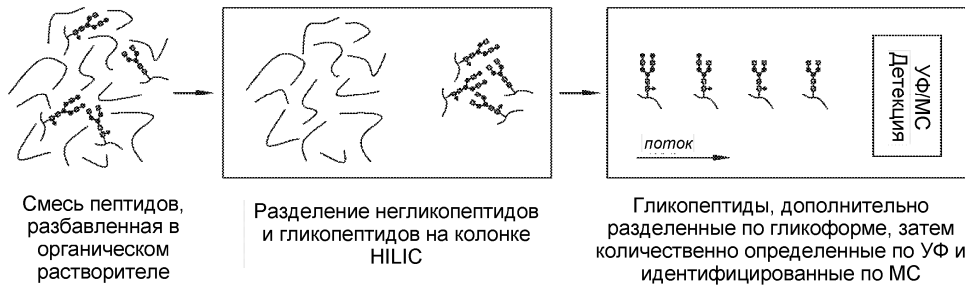
Фиг. 1

Гликан	% от Всех Гликоформ		
	Гликопептид	Высвобожденный Гликан	
	0,51	0,10	
	0,44	НО	
	2,50	0,26	
	2,46	1,60	
	5,43	0,30	
	12,25	13,09	
	3,75	НО	
	23,57	34,12	
	7,66	2,41 (1-6) 3,30(1-3)	5,71
	28,12	14,01 (1-6) 16,16 (1-3)	30,17
	2,67	1,14	
	10,65	11,21	

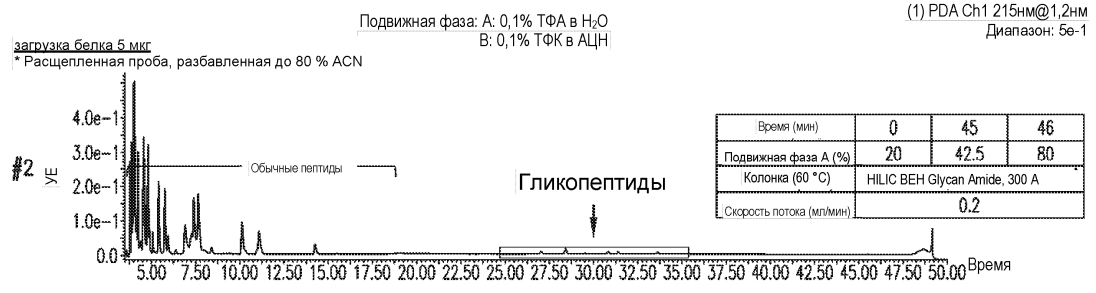
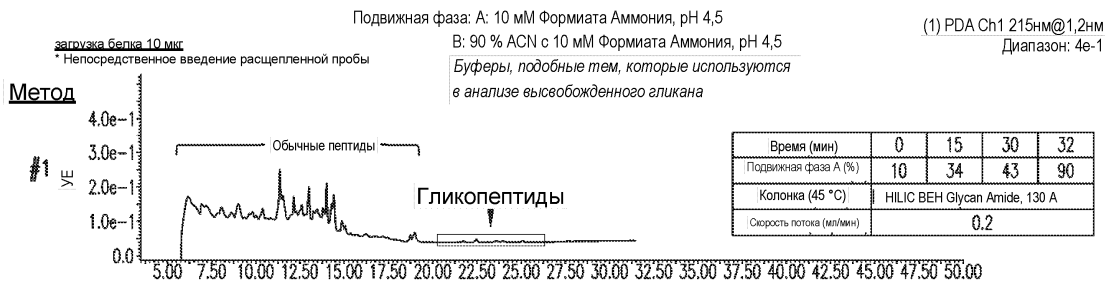
Фиг. 2



Фиг. 3

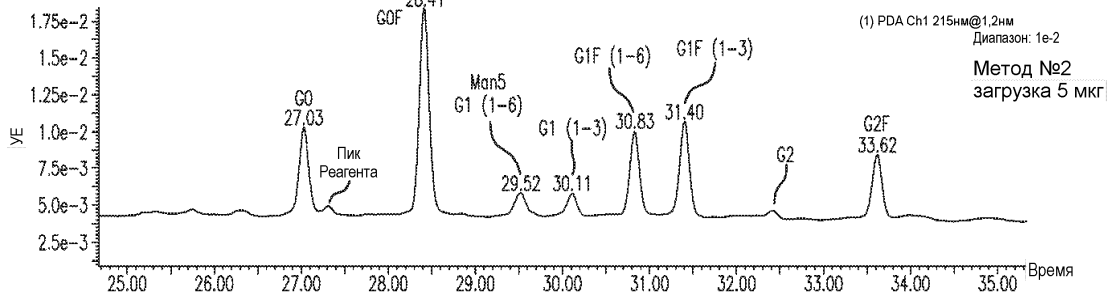
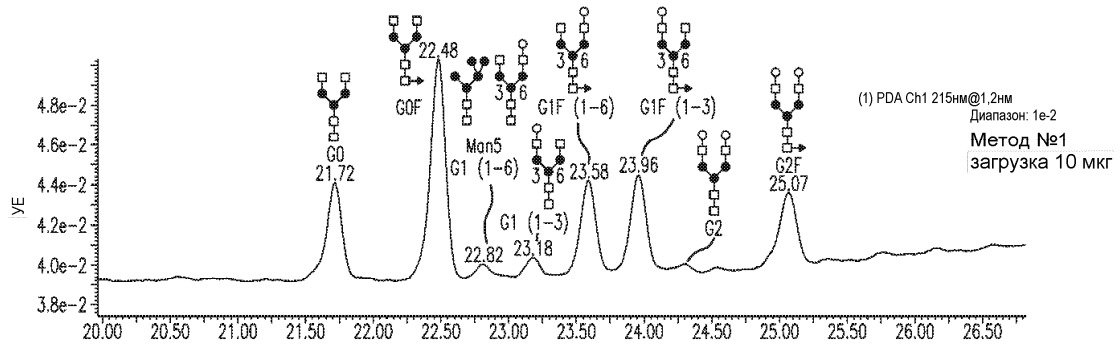


Фиг. 4

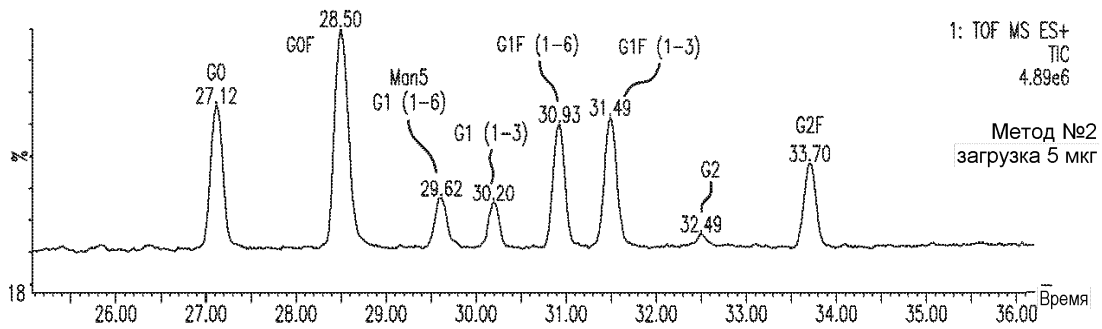
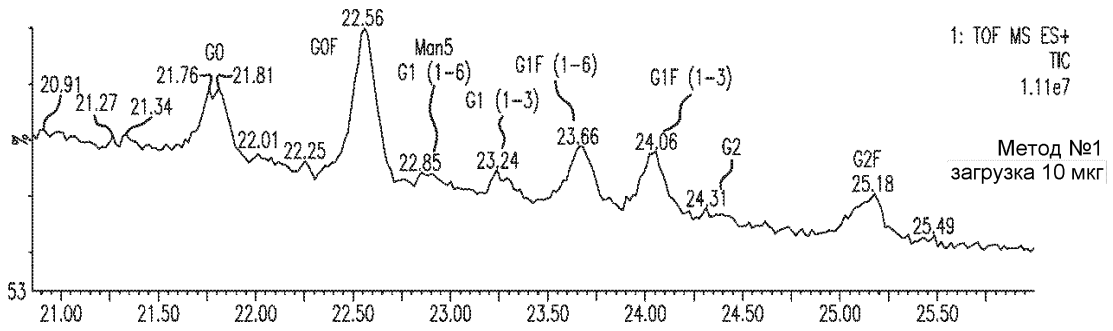


Фиг. 5

047458

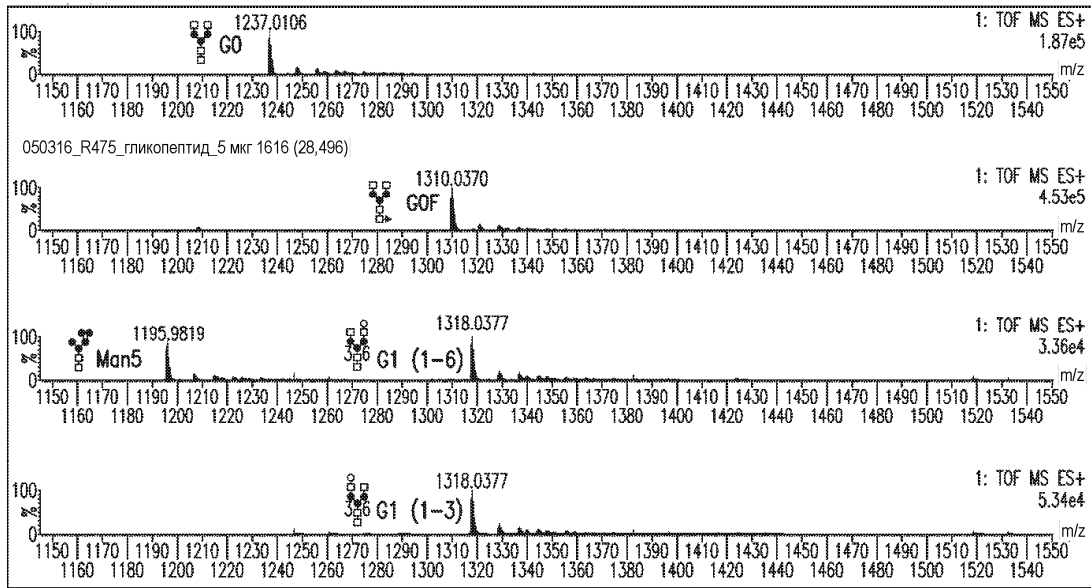


Фиг. 6



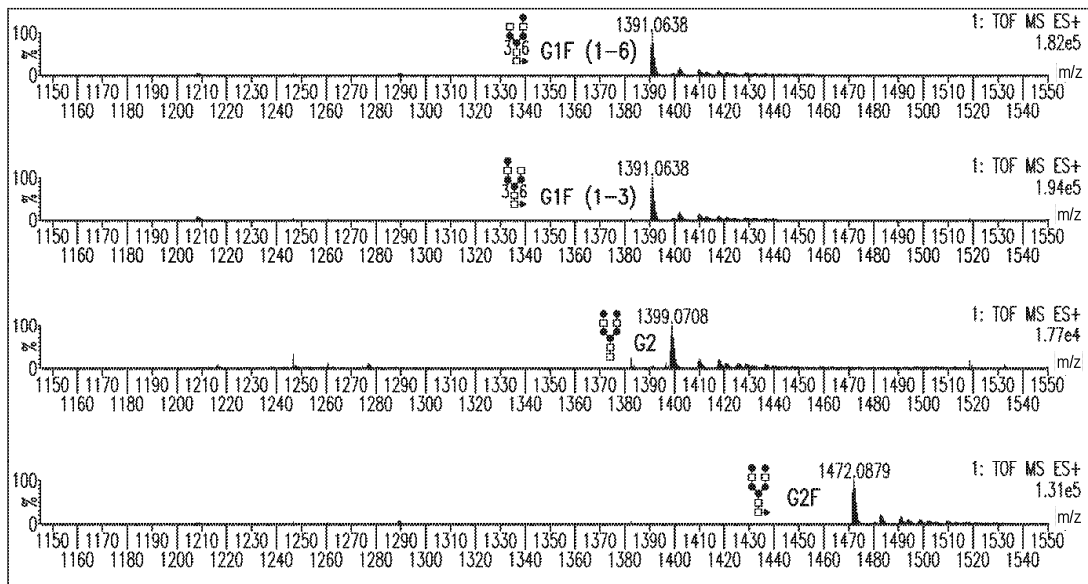
Фиг. 7

МС1 mAb1 гликопептидов (ионы M^{2+})
 Метод №2
 mAb1 Гликопептид: HC 292EEQFNSTYR³⁰⁰

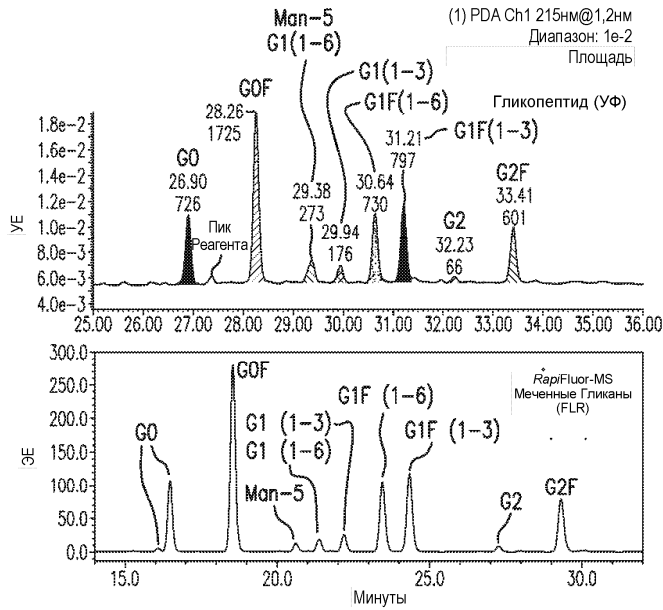


Фиг. 8А

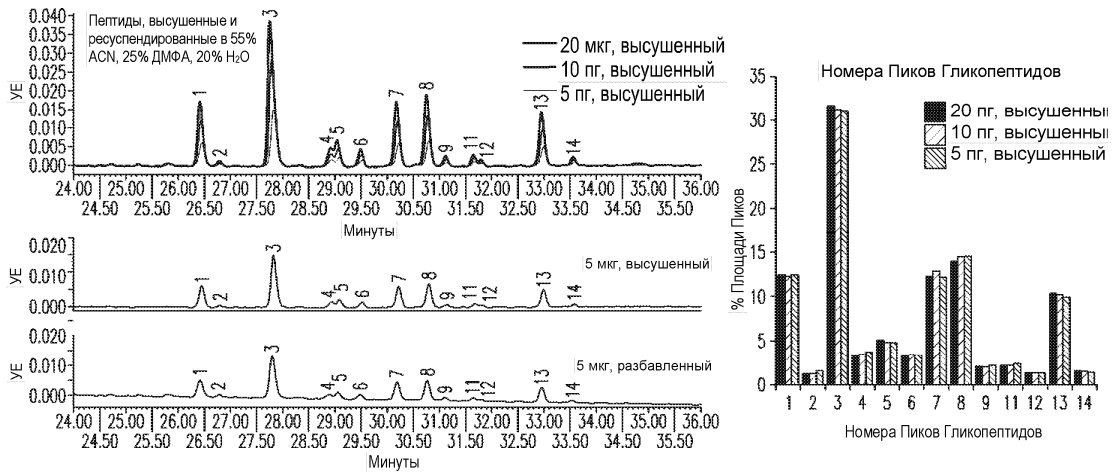
МС1 mAb1 гликопептидов (ионы M^{2+})
 Метод №2
 mAb1 Гликопептид: HC 292EEQFNSTYR³⁰⁰



Фиг. 8В

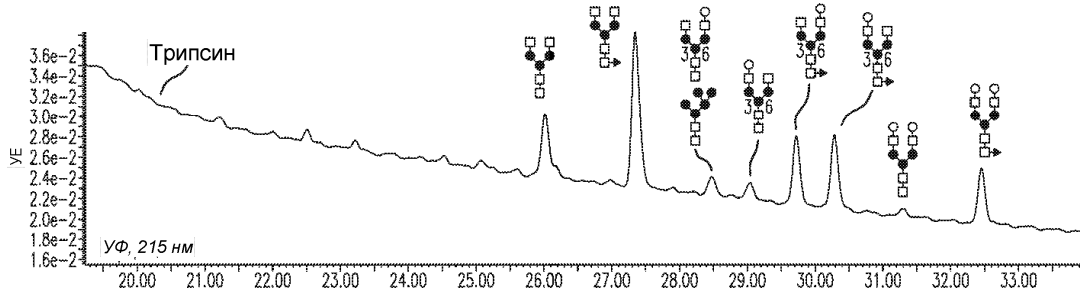


Фиг. 9

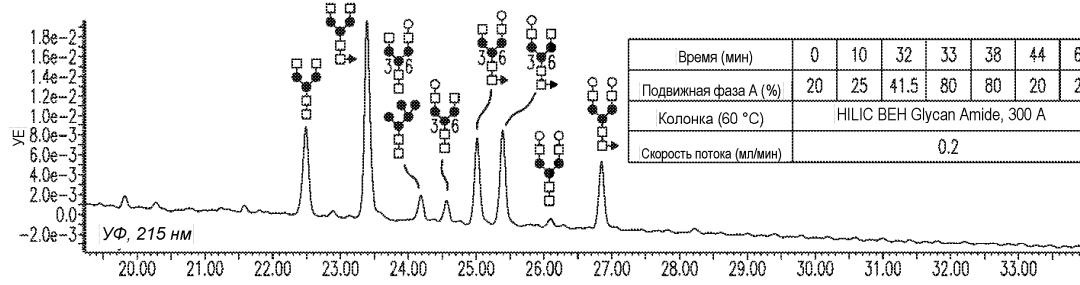


Фиг. 10

047458



Буфер А: 0,1% ТФА в Воде
Буфер В: 0,1% ТФК в АЦН

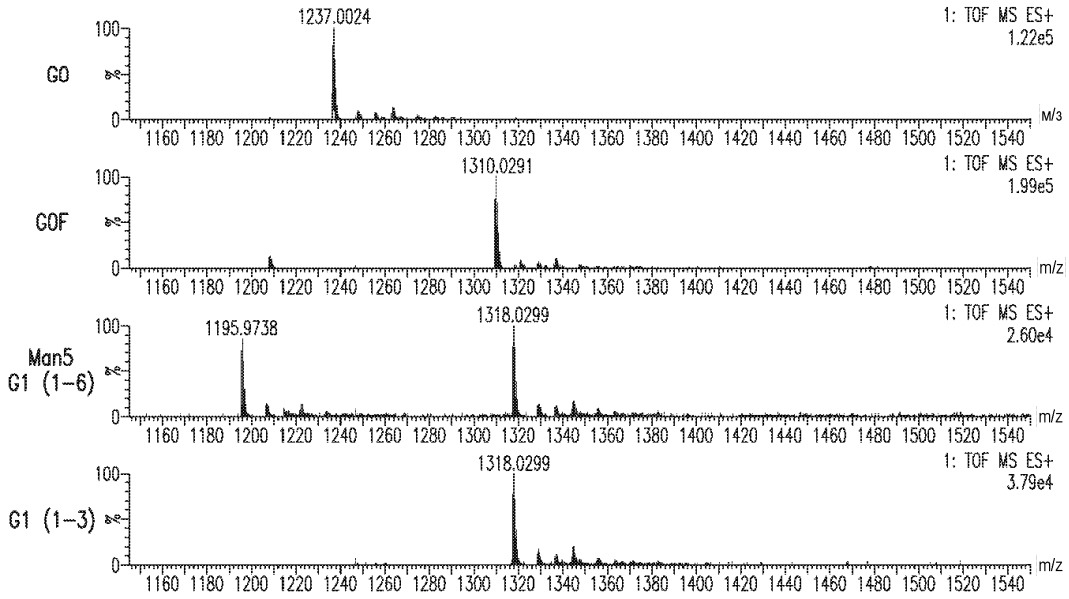


Время (мин)	0	10	32	33	38	44	60
Подвижная фаза А (%)	20	25	41.5	80	80	20	20
Колонка (60 °С)	HILIC BEH Glycan Amide, 300 A						
Скорость потока (мл/мин)	0.2						

Буфер А: 0,05% ТФА в Воде
Буфер В: 0,045% ТФК в АЦН

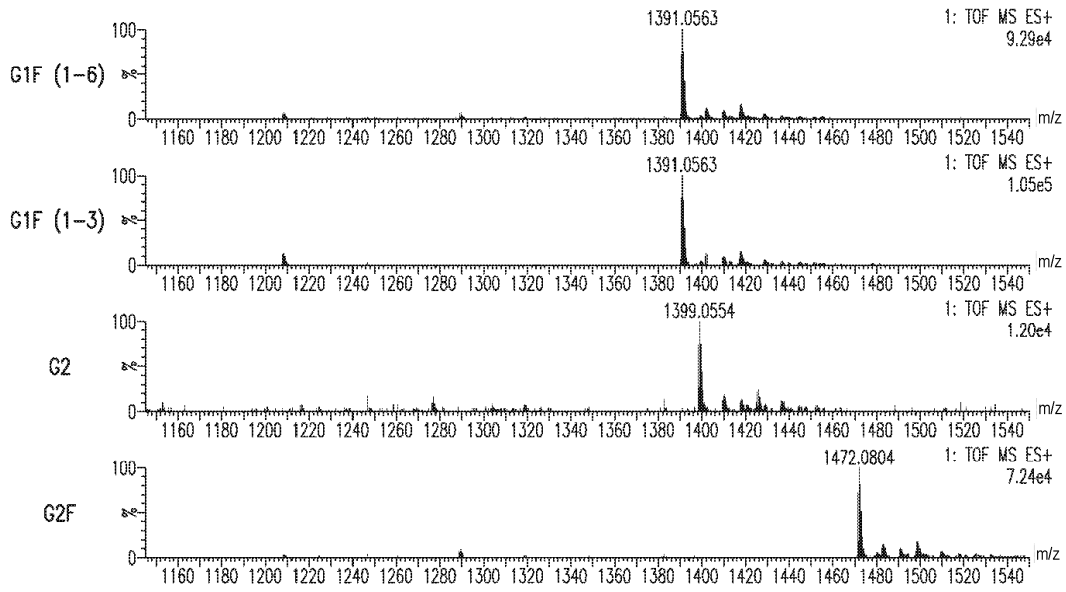
Фиг. 11

0,1% ТФА в Воде / 0,1% ТФА в АСН



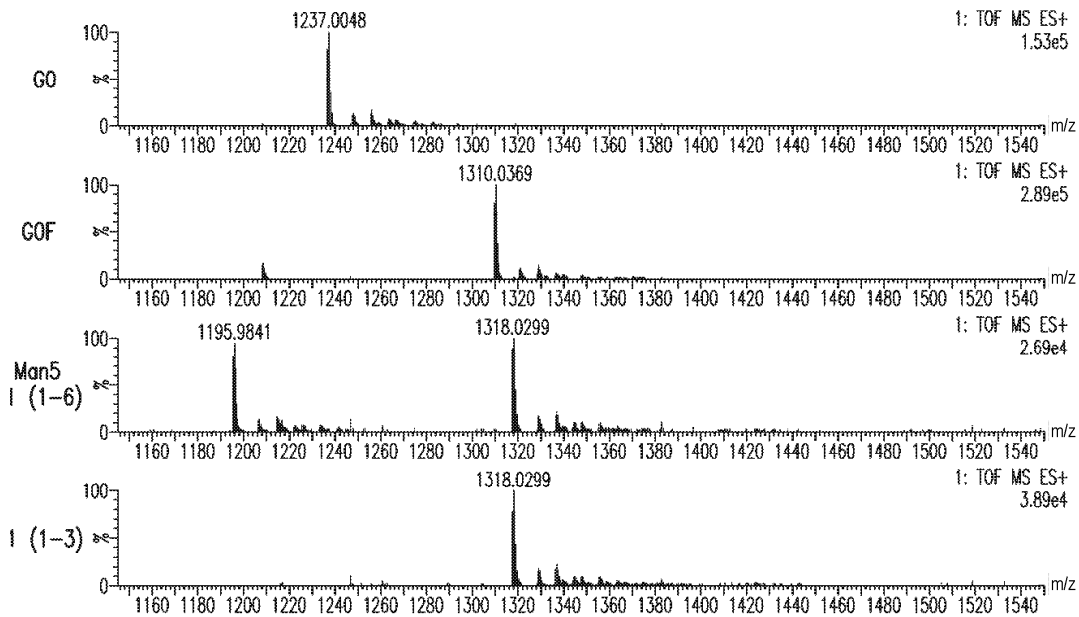
Фиг. 12А

0,1% ТФА в Воде / 0,1% ТФА в АСН



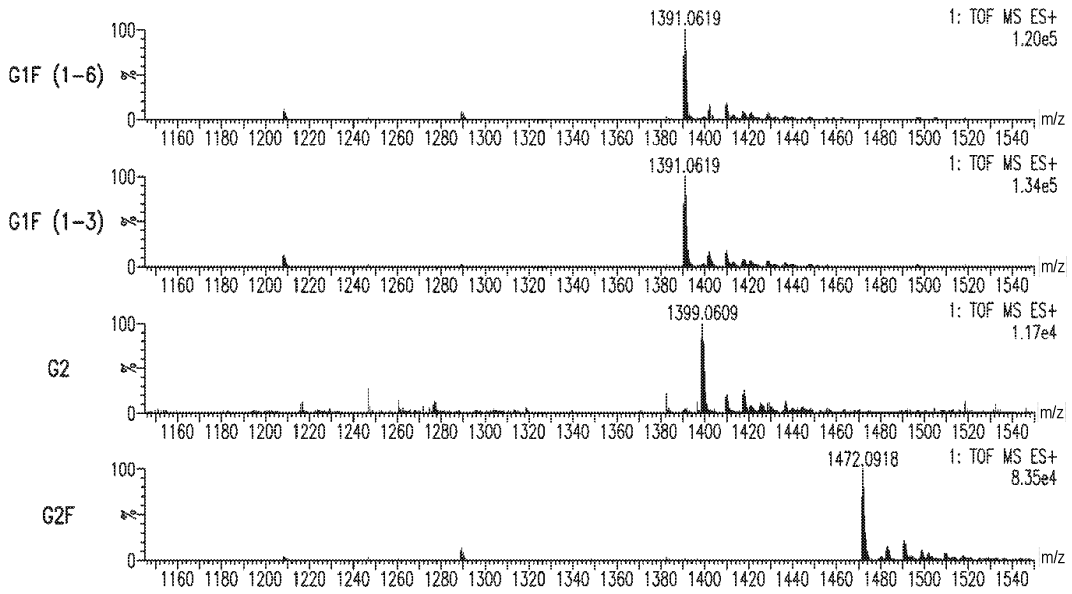
Фиг. 12В

0,05% ТФА в Воде / 0,045% ТФА в АСН

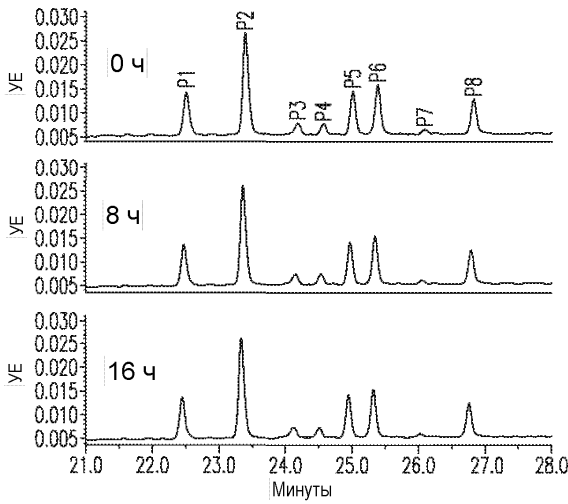


Фиг. 12С

0,05% ТФА в Воде / 0,045% ТФА в АСН



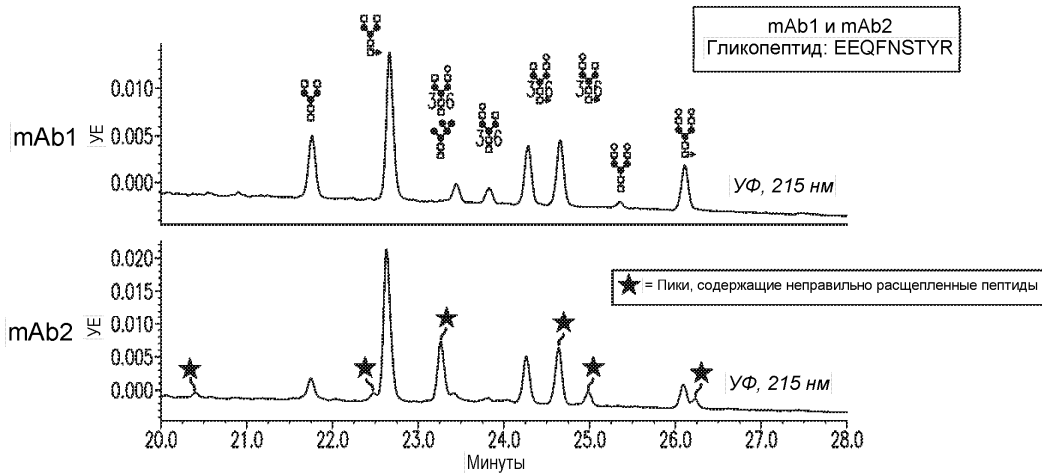
Фиг. 12D



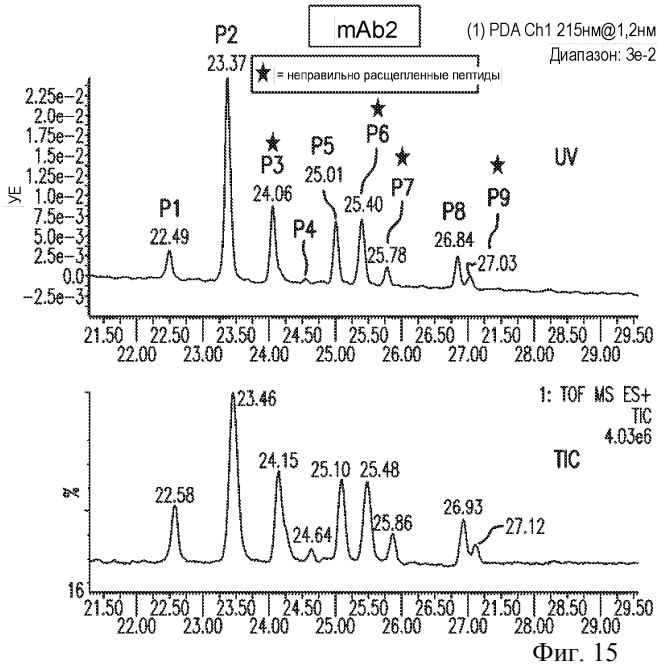
Время	% Площади Пиков (ПП)							
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
0 ч	14,56	33,74	4,49	3,30	13,96	16,43	1,71	11,81
8 ч	14,24	34,20	4,59	3,31	13,81	16,29	1,46	12,10
16 ч	14,56	34,55	4,74	3,25	13,56	15,86	1,54	11,94
	% Разницы							
8 и 0 ч	2,2%	1,4%	2,2%	0,3%	1,1%	0,9%	14,6%	2,5%
16 и 0 ч	0,0%	2,4%	5,6%	1,5%	2,9%	3,5%	9,9%	1,1%

% Разницы в % ПП для основных гликанов ≤ 3,5%

Фиг. 13

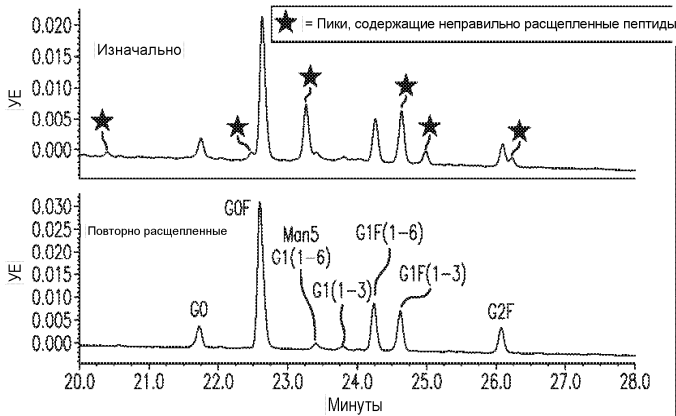


Фиг. 14



Гликан	Гликопептид	% Площади Пиков Соединений Гликанов		
		применяли ХИС для удаления площади пиков неправильно расщепленных пептидов	RapiFluor-MS Меченные Гликаны	
			Изначально	Из 100%
P1	GO	7,75	6,09	6,31
P2	GOF	52,62	50,75	52,60
P3	Man5	1,61	1,60	1,65
	G1(1-6)	0,97	0,77	0,80
P4	G1(1-3)	0,84	0,87	0,90
P5	G1F(1-6)	15,40	14,95	15,50
P6	G1F(1-3)	12,67	13,24	13,72
-	G2	HO	0,28	0,29
P8	G2F	8,15	7,94	8,23

Фиг. 15

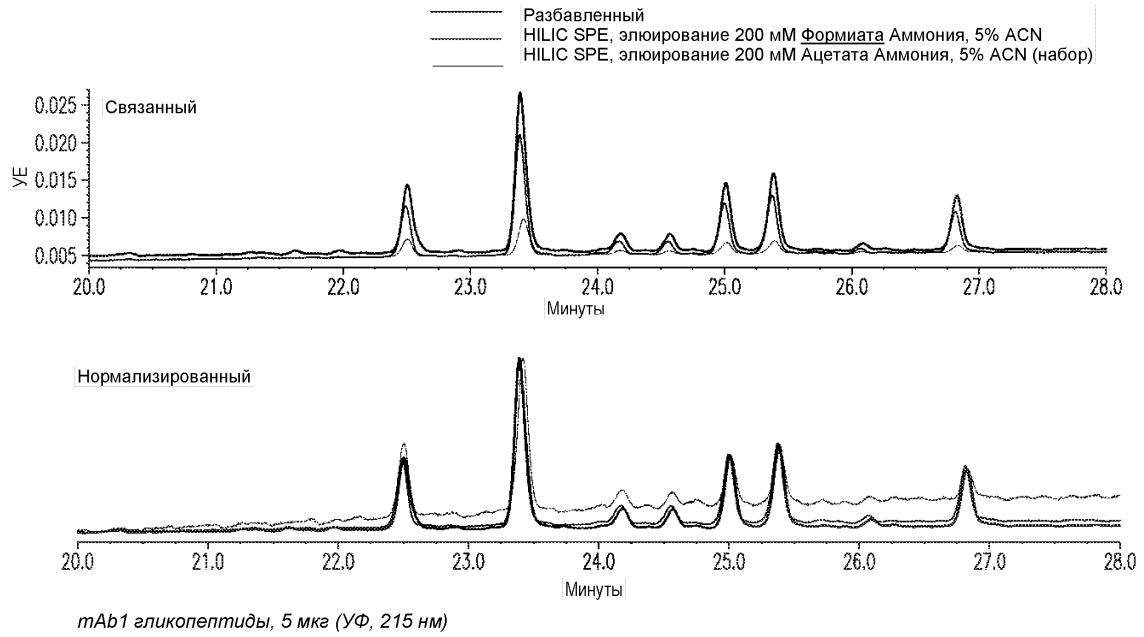


Гликан	% Площади Пиков Соединений Гликанов			
	Гликопептид		Меченные Гликаны	
	ХИС Изначально	После повторного расщепления	Изначально	Из 100%
GO	7,75	7,86	6,09	6,31
GOF	52,62	51,47	50,75	52,60
Man5	1,61	2,73	1,60	1,65
G1(1-6)	0,97		0,77	0,80
G1(1-3)	0,84	1,22	0,87	0,90
G1F(1-6)	15,40	15,00	14,95	15,50
G1F(1-3)	12,67	13,11	13,24	13,72
G2	HO	HO	0,28	0,29
G2F	8,15	8,60	7,94	8,23

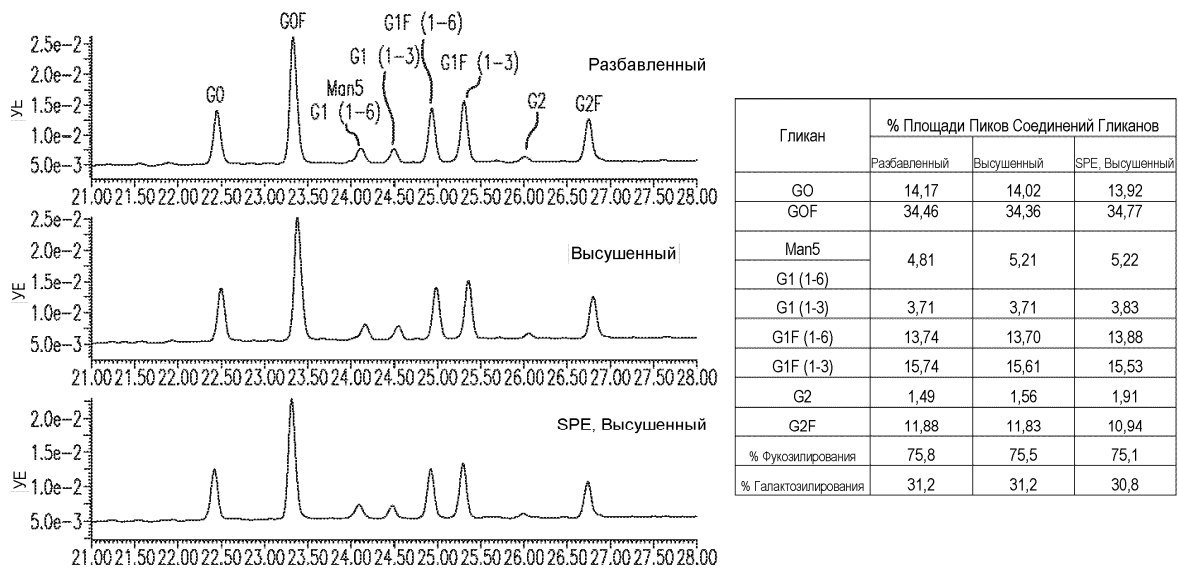
- расщепленная проба mAb2 pH повышен 3 М Трис-основания
- добавляли 1:5 трипсин, инкубировали при 50 °С в течение 1 ч (750 об/мин)
- добавлено 0,2% ТФА (окончательно),* разбавлено до ~80% АСН

*для растворимости гликопептидов в растворителе с высоким содержанием органического растворителя необходим низкий pH

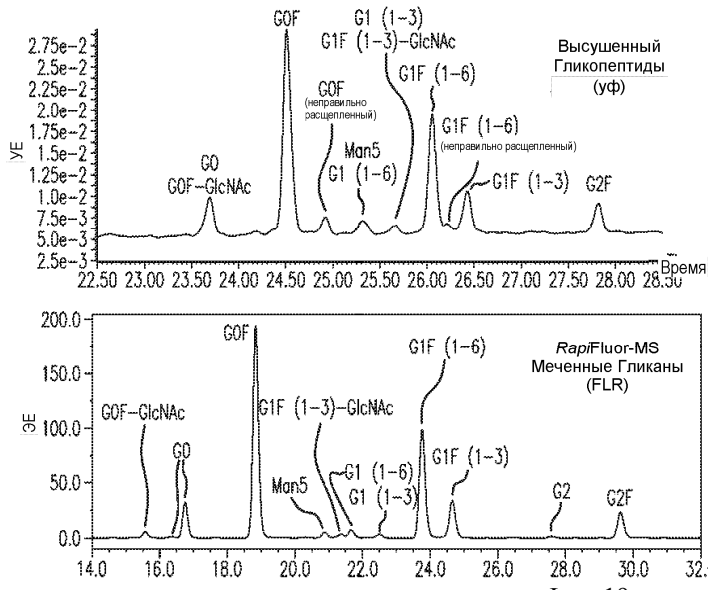
Фиг. 16



Фиг. 17

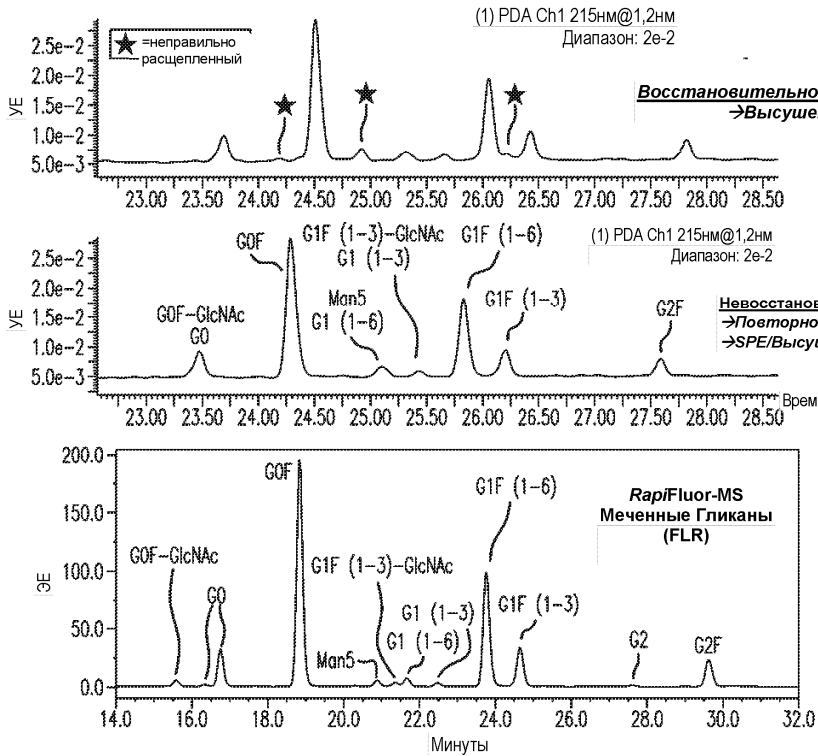


Фиг. 18



Гликан	% Площади Пиков Соединений Гликанов		
	Высушенный Гликопептиды	RapiFluor-MS Меченные Гликаны	
		Изначально	Из 100%
GOF-GlcNAc	1,24	1,31	1,34
GO	8,36	7,42	7,59
GOF	44,16	45,07	46,09
Man5	1,67	1,24	1,27
G1F(1-3)-GlcNAc	0,83	0,84	0,86
G1 (1-6)	1,95	1,7	1,74
G1 (1-3)	1,27	0,83	0,85
G1F (1-6)	24,92	24,25	24,80
G1F (1-3)	8,8	8,57	8,76
G2	HO	0,41	0,42
G2F	6,8	6,14	6,28
% Фукозирования	86,8	86,2	88,1
% Галактозилирования	25,7	24,6	25,2

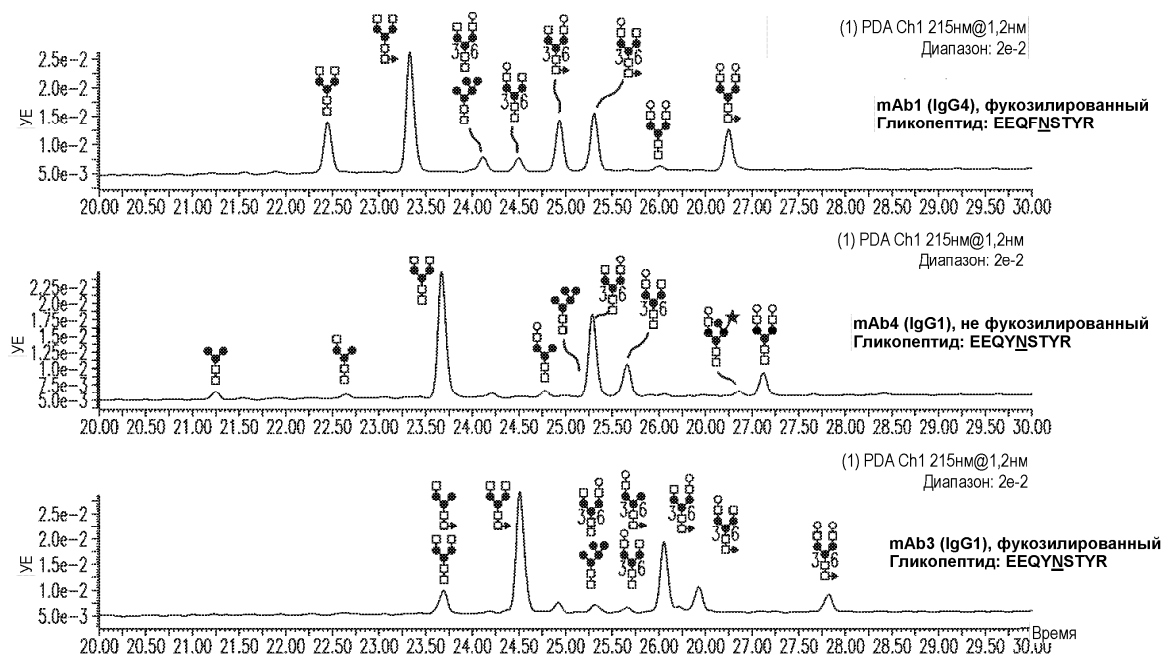
Фиг. 19



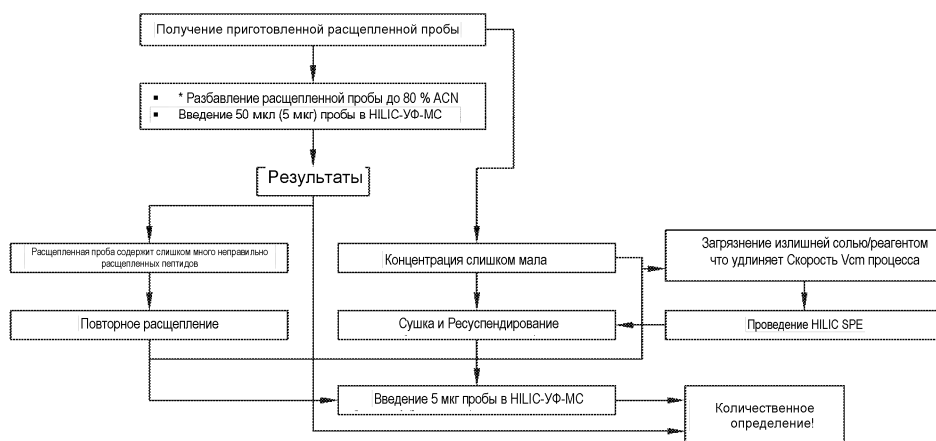
Фиг. 20А

Гликан	% Площади Пиков Соединений Гликанов			
	Гликопептиды		RapiFluor-MS Меченные Гликаны	
	Восстановительное	Невосстановительное	Изначально	Из 100%
	Высушенный	Повторно расщепленные SPE/Высушенный		
GOF-GlcNAc	1,24	0,98	1,31	1,34
GO	8,36	8,25	7,42	7,59
GOF	44,16	46,33	45,07	46,09
Man5	1,67	1,73	1,24	1,27
G1F (1-3)- GlcNAc	0,83	0,93	0,84	0,86
G1 (1-6)	1,95	2,33	1,7	1,74
G1 (1-3)	1,27	0,96	0,83	0,85
G1F (1-6)	24,92	24,96	24,25	24,80
G1F (1-3)	8,8	8,44	8,57	8,76
G2	HO	HO	0,41	0,42
G2F	6,8	5,09	6,14	6,28
% Фукозилирования	86,8	86,7	86,2	88,1
% Галактозилирования	25,7	23,9	24,6	25,2

Фиг. 20В



Фиг. 21



Фиг. 22

