

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490211** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2024.03.13

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

(22) Дата подачи заявки  
2022.07.12

(54) **N-КОНЦЕВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ БЕЛКА DE NOVO С ПОМОЩЬЮ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО В ОТНОШЕНИИ ПОЛОЖЕНИЯ ДИМЕТИЛИРОВАНИЯ**

(31) 63/221,454

(72) Изобретатель:

(32) 2021.07.13

**Фын Юй, Ванг Шунхай (US)**

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2022/036876

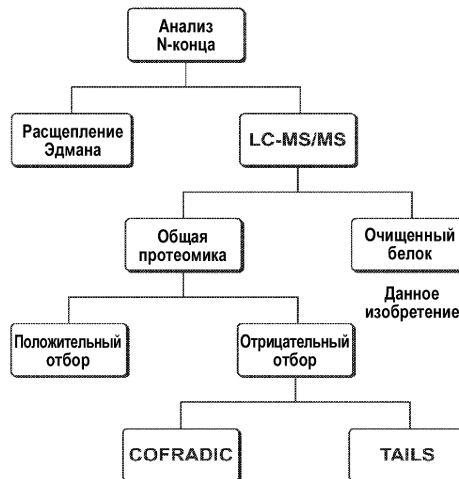
**Медведев В.Н. (RU)**

(87) WO 2023/287828 2023.01.19

(71) Заявитель:

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

(57) Данное изобретение в целом относится к способам определения аминокислотной последовательности белка. В частности, данное изобретение относится к применению избирательного в отношении положения диметилирования и жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией для усиления сигнала N-концевых пептидов и смещения сигнала N-концевых пептидов и соответствующих ионов b, тем самым облегчая определение последовательности N-концевых пептидов.



202490211

A1

A1

202490211

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580206EA/030

### **N-КОНЦЕВОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ БЕЛКА DE NOVO С ПОМОЩЬЮ ИЗБИРАТЕЛЬНОГО В ОТНОШЕНИИ ПОЛОЖЕНИЯ ДИМЕТИЛИРОВАНИЯ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[1] Настоящая заявка заявляет приоритет и преимущество согласно предварительной заявке на патент США № 63/221,454, поданной 13 июля 2021 года, которая включена в данный документ посредством ссылки.

#### **ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[2] Данное изобретение в целом относится к способам секвенирования белков *de novo*.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[3] Белковые терапевтические средства играют важную роль в лечении и диагностике множества заболеваний. Чтобы обеспечить целостность и качество белковых терапевтических средств, необходимо определить и подтвердить последовательности белков и другие структурные свойства. Распространенный способ секвенирования терапевтических белков включает применение жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC-MS). Однако способы LC-MS имеют ограничения, которые препятствуют надежному секвенированию N-концевых доменов белков, включая низкую эффективность ионизации, подавление ионов и блокирование N-концевых аминов.

[4] Были разработаны различные способы для содействия идентификации N-конца, особенно для применений в протеомике. Как правило, они включают химическую модификацию аминокислотных групп и либо положительный, либо отрицательный отбор для обогащения в отношении N-концевых пептидов. Один из таких способов включает реакцию диметилирования N-концевых остатков белка для содействия идентификации N-конца. Однако эти способы в целом применяют для идентификации белков в протеомном анализе, а не для секвенирования очищенного белка *de novo*. Таким образом, существует потребность в простых и надежных способах секвенирования очищенного белка *de novo*.

#### **СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[5] Был разработан способ секвенирования N-конца белка *de novo*, как проиллюстрировано на Фиг. 1. Способ включает подвергание белка в образце реакции избирательного в отношении положения диметилирования, так что предпочтительно диметилируется N-концевой амин. Реакцию диметилирования можно погасить с помощью реагента для остановки реакции. Белок можно расщеплять с помощью ферментов и подвергать LC-MS-анализу. Диметилированные N-концевые остатки образуют иммоний-ионы, которые обеспечивают более высокую интенсивность сигнала и характерный сдвиг времени удержания и массовый сдвиг, что позволяет легко идентифицировать N-концевой пептид и N-концевой остаток. Такую идентификацию затем можно использовать для определения N-концевой последовательности белка.

[6] Данное изобретение относится к способу определения аминокислотной

последовательности N-концевого домена представляющего интерес белка. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения способ включает (а) приведение образца, включающего представляющий интерес белок, в контакт с по меньшей мере одним реагентом для диметилирования с образованием смеси для диметилирования; (b) приведение указанной смеси для диметилирования в контакт с по меньшей мере одним реагентом для остановки реакции с образованием смеси с остановленной реакцией; (с) подвергание указанной смеси с остановленной реакцией анализу на основе жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией, причем в указанном анализе ионизируется по меньшей мере один диметилированный аминокислотный остаток с образованием по меньшей мере одного иммоний-иона; (d) идентификацию по меньшей мере одного N-концевого пептида исходя из присутствия указанного по меньшей мере одного иммоний-иона; и (е) сравнение масс-спектра указанного по меньшей мере одного N-концевого пептида из (d) с масс-спектром соответствующего по меньшей мере одного N-концевого пептида недиметилированного контрольного образца для определения аминокислотной последовательности N-концевого домена указанного представляющего интерес белка, причем указанный по меньшей мере один реагент для диметилирования из (а) приводят в контакт в условиях, которые предпочтительно приводят к диметилированию N-концевого  $\alpha$ -амин.

[7] В одном аспекте указанный представляющий интерес белок представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитела и лекарственного средства, фрагмент антитела или белковый лекарственный препарат.

[8] В одном аспекте указанный по меньшей мере один реагент для диметилирования выбран из группы, состоящей из  $\text{HCHO}$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , их тяжелых изотопов и их комбинации. В другом аспекте указанная смесь для диметилирования имеет уровень pH ниже 3. В еще одном аспекте указанная смесь для диметилирования включает уксусную кислоту. В дополнительном аспекте указанная смесь для диметилирования имеет температуру от около  $20^\circ\text{C}$  до около  $37^\circ\text{C}$ . В еще одном аспекте указанную смесь для диметилирования инкубируют в течение от около 5 минут до около 1 часа.

[9] В одном аспекте указанный реагент для остановки реакции выбран из группы, состоящей из  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_2\text{OH}$  и их комбинации. В другом аспекте указанная смесь с остановленной реакцией имеет температуру от около  $20^\circ\text{C}$  до около  $37^\circ\text{C}$ . В еще одном аспекте указанную смесь с остановленной реакцией инкубируют в течение от около 5 минут до около 1 часа.

[10] В одном аспекте способ дополнительно включает приведение указанного образца и/или указанной смеси с остановленной реакцией в контакт с по меньшей мере одним расщепляющим ферментом. В конкретном аспекте указанный по меньшей мере один расщепляющий фермент выбран из группы, состоящей из трипсина, химотрипсина, LysC, LysN, AspN, GluC, ArgC и их комбинации.

[11] В одном аспекте указанная жидкостная хроматография включает обращенно-

фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматографию со смешанным режимом или их комбинацию. В другом аспекте указанная система жидкостной хроматографии соединена с указанным масс-спектрометром.

[12] В одном аспекте указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением или тройной квадрупольный масс-спектрометр. В другом аспекте указанный масс-спектрометр способен осуществлять отслеживание множественных реакций или отслеживание параллельных реакций.

[13] В одном аспекте способ дополнительно включает приведение указанного образца и/или указанной смеси с остановленной реакцией в контакт с по меньшей мере одним алкилирующим средством. В конкретном аспекте указанное алкилирующее средство представляет собой йодацетамид.

[14] В одном аспекте способ дополнительно включает приведение указанного образца и/или указанной смеси с остановленной реакцией в контакт с по меньшей мере одним восстанавливающим средством. В конкретном аспекте указанное восстанавливающее средство представляет собой дитиотреитол.

[15] В одном аспекте способ дополнительно включает приведение указанного образца в контакт с по меньшей мере одним денатурирующим средством. В конкретном аспекте указанное денатурирующее средство представляет собой мочевины.

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

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[17] На Фиг. 1 проиллюстрирован анализ N-конца из уровня техники и потребности, удовлетворяемые с помощью способа по данному изобретению, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[18] На Фиг. 2 проиллюстрированы возможные N-концевые модификации и C-концевые модификации, которые влияют на анализ белка, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[19] На Фиг. 3 показана структура иммоний-иона, образующегося при индуцированной столкновениями диссоциации (CID), и амплифицированный сигнал указанного иона в масс-спектре в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[20] На Фиг. 4 проиллюстрирован протокол не избирательного в отношении положения диметилирования в соответствии с иллюстративным вариантом реализации

изобретения.

[21] На Фиг. 5 показано перекрытие последовательностей белка с использованием не избирательного в отношении положения диметилирования в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[22] На Фиг. 6 показан масс-спектр, включающий иммоний-ион диметилированного серина в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[23] На Фиг. 7 проиллюстрирован протокол избирательного в отношении положения диметилирования в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[24] На Фиг. 8 показано перекрытие последовательностей белка с использованием избирательного в отношении положения диметилирования в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[25] На Фиг. 9 показаны результаты сравнения общих хроматограмм ионов (TIC) в случае способов избирательного в отношении положения диметилирования с использованием способа с применением фильтра с границей отсечки по молекулярной массе (MWCO) или однореакторного способа в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[26] На Фиг. 10 показаны тестируемые и оптимизированные параметры способа избирательного в отношении положения диметилирования в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[27] На Фиг. 11А показана структура слитого белка Ab1, включая молекулы, образующиеся в результате основных усечений, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[28] На Фиг. 11В показана аминокислотная последовательность Ab1, включая сайты основного усечения, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[29] На Фиг. 11С показан масс-спектр Ab1, анализируемого с использованием избирательного в отношении положения диметилирования, с идентифицированным иммоний-ионом Y сайта основного усечения, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[30] На Фиг. 11D показан масс-спектр Ab1, анализируемого с использованием избирательного в отношении положения диметилирования, с идентифицированным иммоний-ионом D сайта основного усечения, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[31] На Фиг. 11Е показан масс-спектр Ab1, анализируемого с использованием избирательного в отношении положения диметилирования, с идентифицированным иммоний-ионом T сайта основного усечения, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[32] На Фиг. 12 показан протокол избирательного в отношении положения

диметилирования NISTmAb и соответствующие масс-спектры в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[33] На Фиг. 13А показана SEC-MS TIC FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[34] На Фиг. 13В показана последовательность IdeS в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[35] На Фиг. 13С показан масс-спектр для интактных молекул FabRICATOR<sup>®</sup> с неизвестными N-концевыми последовательностями, обозначенными в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[36] На Фиг. 13D показаны масс-спектры FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[37] На Фиг. 14А показаны хроматограммы контроля и диметилированного N-концевого пептида 1 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[38] На Фиг. 14В показаны MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 1 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[39] На Фиг. 14С показаны MS/MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 1 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[40] На Фиг. 15А показаны хроматограммы контроля и диметилированного N-концевого пептида 2 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[41] На Фиг. 15В показаны MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 2 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[42] На Фиг. 15С показаны MS/MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 2 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[43] На Фиг. 16А показаны хроматограммы контроля и диметилированного N-концевого пептида 3 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[44] На Фиг. 16В показаны MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 3 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[45] На Фиг. 16С показаны MS/MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 3 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[46] На Фиг. 17А показаны хроматограммы контроля и диметилированного N-концевого пептида 4 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом

реализации изобретения.

[47] На Фиг. 17В показаны MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 4 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[48] На Фиг. 17С показаны MS/MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 4 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[49] На Фиг. 18А показаны хроматограммы контроля и диметилированного N-концевого пептида 5 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[50] На Фиг. 18В показаны MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 5 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[51] На Фиг. 18С показаны MS/MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 5 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[52] На Фиг. 19А показаны хроматограммы контроля и диметилированного N-концевого пептида 6 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[53] На Фиг. 19В показаны MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 6 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[54] На Фиг. 19С показаны MS/MS-спектры контроля и диметилированного N-концевого пептида 6 FabRICATOR<sup>®</sup> в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[55] На Фиг. 20А показаны результаты выравнивания основных N-концевых последовательностей FabRICATOR<sup>®</sup>, идентифицированных с использованием избирательного в отношении положения диметилирования в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[56] На Фиг. 20В показана менее распространенная N-концевая последовательность FabRICATOR<sup>®</sup>, идентифицированная с использованием избирательного в отношении положения диметилирования, и соответствующие MS/MS-спектры, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[57] На Фиг. 20С показаны последовательности FabRICATOR<sup>®</sup>, дополненные основной и менее распространенной N-концевыми последовательностями, идентифицированными с использованием избирательного в отношении положения диметилирования, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[58] На Фиг. 20D показан масс-спектр для интактных молекул FabRICATOR<sup>®</sup>, валидирующий N-концевые последовательности, идентифицированные с использованием избирательного в отношении положения диметилирования, в соответствии с

иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[59] На Фиг. 20E показано перекрывание последовательностей FabRICATOR<sup>®</sup> в контроле, недиметилированном образце, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[60] На Фиг. 20F показано перекрывание последовательностей FabRICATOR<sup>®</sup> в образце, подвергнутом избирательному в отношении положения диметилированию, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[61] На Фиг. 21A показаны оптимизированные условия для избирательного в отношении положения диметилирования в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

[62] На Фиг. 21B проиллюстрирован способ сбора данных MS/MS, запускаемый иммоний-ионами, в соответствии с иллюстративным вариантом реализации изобретения.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[63] Белковые терапевтические средства, в особенности моноклональные антитела, играют значительную роль в лечении и диагностике множества заболеваний. Ненадлежащее качество терапевтического белка может вызвать нежелательные иммунные ответы у пациентов, потерю активности лекарственного средства или нежелательные эффекты. Чтобы обеспечить целостность и качество белковых терапевтических средств, необходимо определить и подтвердить последовательности белков и другие структурные свойства.

[64] Распространенный способ анализа терапевтических белков, включая секвенирование, включает применение жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией. Пептидная последовательность может быть определена на основе анализа фрагментов MS/MS, полученных в результате индуцированной столкновениями диссоциации (CID) или распада за пределами источника (PSD) выбранного молекулярного иона. Однако идентификация N-концевого пептида белка сопровождается уникальными сложностями. Ионы  $b$ , наблюдаемые в масс-спектрах CID, как правило, образуют стабильные структуры за счет циклизации протонированных молекул оксалонона. Однако эта циклизация невозможна для иона  $b_1$ , содержащего N-концевой остаток N-концевого пептида, что приводит к пропуску иона  $b_1$  в масс-спектрах и невозможности определить N-концевой остаток белка традиционными способами (Hsu *et al.*, 2005, *J Proteome Res*, 4:101-108).

[65] Был разработан ряд способов для содействия идентификации N-конца, особенно для применений в протеомике. Как правило, они включают химическую модификацию аминокислотных групп и либо положительный, либо отрицательный отбор для обогащения в отношении N-концевых пептидов (Niedermaier *et al.*, 2019, *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 1867(12):140138). Конкретный способ включает применение формальдегида для диметилирования N-концевой  $\alpha$ -аминогруппы и  $\epsilon$ -аминогрупп лизина (Hsu *et al.*). Диметилированный N-концевой остаток при ионизации образует иммоний-ион, повышая его эффективность ионизации и детектируемый сигнал в MS, как показано



на Фиг. 3. N-концевое диметилирование также вызывает предсказуемый массовый сдвиг, что облегчает идентификацию N-концевого пептида и ионов b, содержащих N-концевой остаток.

[66] Методики диметилирования для протеомики были дополнительно оптимизированы, например, с помощью методики TAILS или методики DiLeu cPILOT (Marino *et al.*, 2015, *ACS Chem Biol*, 10:1754-1764; Frost *et al.*, 2018, *Anal Chem*, 90:10664-10669). Frost *et al.* продемонстрировали применение кислых условий для модификации реакции диметилирования: путем осуществления реакции при низких уровнях pH, при этом в реакцию предпочтительно вступают N-концевые  $\alpha$ -аминогруппы (которые имеют более низкую pKa), тогда как  $\epsilon$ -аминогруппы боковой цепи лизина (которые имеют более высокую pKa) предпочтительно остаются немодифицированными. Для создания образцов для диметилирования контрастных масс были использованы реагенты для диметилирования с применением легких изотопов и тяжелых изотопов. Этот способ комбинировали с изобарическим мечением лизиновых остатков для осуществления 2D-плексного протеомного анализа сложного образца для идентификации белков в образце. Однако этот и другие описанные способы N-концевого мечения, как правило, ограничиваются использованием в протеомике и не применяются для секвенирования очищенных белков *de novo*, что необходимо, например, для определения характеристик терапевтических белков при разработке лекарственных средств.

[67] Совсем недавно был разработан способ N-концевого секвенирования очищенного белка *de novo* путем флуоресцентного мечения незаблокированных N-концевых остатков (Vecchi *et al.*, 2019, *Anal Chem*, 91:13591-13600). Для этого способа требуется применение флуоресцентного детектора, работающего в режиме реального времени, и в нем не можно было метить N-концы, которые преимущественно заблокированы, например, пироглутаматом. Vecchi *et al.* попытались обойти эту проблему, добавив второй экспериментальный прогон, сравнивающий образцы, которые были подвергнуты расщеплению пироглутамат-аминопептидазой (PGAP) с удалением ругоQ-остатка, с образцами, которые не подвергались расщеплению. Этот метод обхода неспособности способа мечения в достаточной степени идентифицировать N-концевые пептиды добавляет уровень сложности и не может учитывать какие-либо N-концевые модификации, кроме ругоQ, например, модификации, проиллюстрированные на Фиг. 2.

[68] Как описано выше и проиллюстрировано на Фиг. 1, существует потребность в простых и чувствительных способах секвенирования очищенных белков *de novo*, особенно для сложного N-концевого домена. В данном описании изложен новый способ мечения, идентификации и секвенирования N-концевого домена белка *de novo*.

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

материалы.

[70] Формы единственного числа следует понимать как означающие «по меньшей мере один», а термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как их понимают специалисты в данной области техники, и в случаях, когда указаны диапазоны, включены конечные точки. В контексте данного документа термины «включать», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера и понимаются как означающие «содержать», «содержит» и «содержащий» соответственно.

[71] В контексте данного документа термин «белок» или «представляющий интерес белок» может включать любой полимер из аминокислот, имеющий ковалентные амидные связи. Белки содержат одну или несколько полимерных цепей из аминокислот, в целом известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных встречающихся в природе структурных вариантов и их синтетических не встречающихся в природе аналогов, связанных пептидными связями. «Синтетический пептид или полипептид» относится к не встречающемуся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные методы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или несколько полипептидов, образуя одну функционирующую биомолекулу. В другом иллюстративном аспекте белок может включать фрагменты антител, наноантитела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Представляющие интерес белки могут включать любые биотерапевтические белки, рекомбинантные белки, используемые в исследованиях или терапии, белки-ловушки и другие химерные слитые белки рецептор-Fc, белки, антитела, моноклональные антитела, поликлональные антитела, человеческие антитела и биспецифические антитела. Белки могут быть получены с использованием рекомбинантных клеточных систем продуцирования, таких как бакуловирусная система насекомых, дрожжевые системы (например, *Pichia sp.*) и системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Недавний обзор, посвященный биотерапевтическим белкам и их получению, см. в Ghaderi et al., “Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation” (Darius Ghaderi et al., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147-176 (2012), все идеи которого включены в данный документ). В некоторых типовых вариантах реализации изобретения белки содержат модификаций, аддукты и другие ковалентно соединенные фрагменты. Эти модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), PEG, полигистидин, FLAG-

метку, мальтозосвязывающий белок (МВР), хитинсвязывающий белок (СВР), глутатион-S-трансферазу (GST) мус-эпитоп, флуоресцентные метки и другие красители и т.п. Белки можно классифицировать на основе состава и растворимости и, таким образом, они могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки.

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

[73] В контексте данного документа термин «рекомбинантный белок» относится к белку, полученному в результате транскрипции и трансляции гена, переносимого рекомбинантным вектором экспрессии, который был введен в подходящую клетку-хозяина. В определенных типовых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может представлять собой антитело, например, химерное, гуманизированное или полностью человеческое антитело. В определенных типовых вариантах реализации изобретения рекомбинантный белок может представлять собой антитело изоотипа, выбранного из группы, состоящей из: IgG, IgM, IgA1, IgA2, IgD или IgE. В определенных типовых вариантах реализации изобретения молекула антитела представляет собой полноразмерное антитело (например, IgG1) или, альтернативно, антитело может представлять собой фрагмент (например, Fc-фрагмент или Fab-фрагмент).

[74] В контексте данного документа термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (обозначаемую в данном документе как LCVR или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (CL1). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных, от amino-конца к карбокси-концу, в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах осуществления данного изобретения FR антитела к big-ET-1 (или его антигенсвязывающая часть) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотную консенсусную последовательность можно определять на основе

сравнительного анализа двух или более CDR. Термин «антитело» в контексте данного документа также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полных антител. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. д. в контексте данного документа включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или полученный с помощью методов генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антител с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, включающие проведение манипуляций и экспрессии ДНК, кодирующей переменные и, необязательно, константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или является легкодоступной, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно подвергать секвенированию и химическим манипуляциям с применением методов молекулярной биологии, например, чтобы разместить один или несколько переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации, или для включения кодонов, внесения цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

[75] В контексте данного документа термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub> (или «Fab<sub>2</sub>»)-фрагмент, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело dsFv, dAb-фрагмент, Fd'-фрагмент, Fd-фрагмент и выделенную область, определяющую комплементарность (CDR), а также триатела, тетраатела, линейные антитела, молекулы одноцепочечных антител и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Fv-фрагменты представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены с помощью пептидного линкера. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, и который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых типовых вариантах реализации изобретения фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сопоставимой с аффинностью исходного антитела, и/или конкурирует с исходным антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела может быть получен любыми средствами. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем посредством фрагментации интактного антитела, и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В некоторых типовых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела может быть получен путем расщепления расщепляющим ферментом

IdeS или его вариантом. Альтернативно, или дополнительно, фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно, или дополнительно, фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, с помощью дисульфидных связей. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот, и более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

[76] Термин «биспецифическое антитело» включает антитело, способное избирательно связывать два или более эпитопов. Биспецифические антитела обычно содержат две разные тяжелые цепи, причем каждая тяжелая цепь специфически связывается с другим эпитопом - либо с двумя разными молекулами (например, антигенами), либо с одной и той же молекулой (например, с одним и тем же антигеном). Если биспецифическое антитело способно к избирательному связыванию двух разных эпитопов (первого эпитопа и второго эпитопа), аффинность первой тяжелой цепи в отношении первого эпитопа обычно будет на по меньшей мере один-два или три, или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи в отношении второго эпитопа, и наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной и той же или на разных мишенях (например, на одном и том же или на разных белках). Биспецифические антитела могут быть получены, например, путем объединения тяжелых цепей, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные последовательности тяжелой цепи, которые распознают разные эпитопы одного и того же антигена, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими разные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут быть экспрессированы в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

[77] Типичное биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен CH1, шарнир, домен CH2 и домен CH3, а также легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может связываться с каждой тяжелой цепью, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и которая может связывать один или несколько эпитопов, связанных с антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание одного или обоих из тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. BsAb можно разделить на два основных класса: те, которые несут Fc-область (IgG-подобные), и те, у которых отсутствует Fc-область, при этом последние обычно имеют меньший размер, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные bsAb могут иметь различные форматы, такие как без ограничения Triomab, IgG с выступами во впадинах (kih IgG), crossMab, orth-Fab IgG, Ig с двумя переменными доменами (DVD-Ig),

Fab «два в одном» или двойного действия (DAF), IgG-одноцепочечные Fv (IgG-scFv) или κλ-тела. Различные отличные от IgG-подобных молекул форматы включают тандемные scFv, формат диатела, одноцепочечное диатело, тандемные диатела (TandAbs), молекулу переориентирующегося антитела с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, наноантитела или антитела, получаемые с помощью метода «замка на причале» (dock-and-lock, DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265-310 (2014), все идеи которого включены в данный документ). Способы получения bsAb не ограничиваются квадратной технологией на основе соматического слияния двух разных линий клеток гибридомы, химической конъюгацией, которая включает химические перекрестносшивающие средства, и генетическими подходами, в которых используется технология рекомбинантных ДНК. Примеры bsAb включают таковые, описанные в следующих патентных заявках, которые включены в данный документ посредством ссылки: США сер. № 12/823838, поданная 25 июня 2010 года; США сер. № 13/488628, поданная 5 июня 2012 года; США сер. № 14/031075, поданная 19 сентября 2013 года; США сер. № 14/808171, поданная 24 июля 2015 года; США сер. № 15/713574, поданная 22 сентября 2017 года; США сер. № 15/713569, поданная 22 сентября 2017 года; США сер. № 15/386453, поданная 21 декабря 2016 года; США сер. № 15/386443, поданная 21 декабря 2016 года; США сер. № 15/22343, поданная 29 июля 2016 года; и США сер. № 15/814095, поданная 15 ноября 2017 года.

[78] В контексте данного документа термин «полиспецифическое антитело» относится к антителу со специфичностью связывания в отношении по меньшей мере двух различных антигенов. Хотя такие молекулы обычно связывают только два антигена (т.е. биспецифические антитела, bsAb), антитела с дополнительными специфичностями, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИ, также могут быть обработаны системой и способом, раскрытыми в данном документе.

[79] В контексте данного документа термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью технологии гибридомы. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, любым доступным или известным в данной области техники способом. Моноклональные антитела, подходящие для целей данного изобретения, могут быть получены с использованием широкого спектра методик, известных в данной области техники, в том числе использование технологий гибридомы, рекомбинантных технологий и технологий фагового дисплея или их комбинаций.

[80] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения представляющий интерес белок может быть получен из клеток млекопитающих. Клетки млекопитающих могут иметь человеческое или отличное от человеческого происхождение и могут включать первичные эпителиальные клетки (например, кератиноциты, эпителиальные клетки шейки матки, бронхиальные эпителиальные клетки, эпителиальные клетки трахеи,

эпителиальные клетки почек и эпителиальные клетки сетчатки), устойчивые клеточные линии и их штаммы (например, эмбриональные клетки почки 293, клетки ВНК, клетки эпителия шейки матки HeLa и клетки сетчатки PER-C6, клетки MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки CHO, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Hep-2, клетки KB, клетки LSI80, клетки LS174T, клетки NCI-H-548, клетки RPMI2650, клетки SW-13, клетки T24, клетки WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-1, клетки LLC-MK2, клетки клона M-3, клетки 1-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки LLC-PK1, клетки PK(15), клетки GHi, клетки GH3, клетки L2, клетки LLC-RC 256, клетки MHiCi, клетки XC, клетки MDOK, клетки VSW и TH-1, клетки B1, клетки BSC-1, клетки RAf, клетки RK, клетки PK-15 или их производные), фибробласты из любой ткани или органа (в том числе, без ограничения, сердца, печени, почки, толстой кишки, кишечника, пищевода, желудка, нервной ткани (головного мозга, спинного мозга), легкого, сосудистой ткани (артерии, вены, капилляра), лимфоидной ткани (лимфатической железы, аденоидов, миндалин, костного мозга и крови), селезенки, а также фибробласты и фибробластоподобные клеточные линии (например, клетки CHO, клетки TRG-2, клетки IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки, характерные для цитруллинемии, клетки Dempsey, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, клетки HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки Midi, клетки CHO, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки Vero, клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T3, клетки F9, клетки SV-T2, клетки M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C3H/10T1/2, клетки HSDMiC3, клетки KLN205, клетки McCoy, L-клетки мыши, клетки штамма 2071 (L-клетки мыши), клетки штамма L-M (L-клетки мыши), клетки L-MTK' (L-клетки мыши), клетки клонов NCTC 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1, клетки Swiss/3T3, клетки индийского мунтжака, клетки SIRC, клетки Cn и клетки Jensen, Sp2/0, NS0, клетки NS1 или их производные).

[81] В контексте данного документа «образец» можно получать на любом этапе биопроцесса, как, например, на этапе культуральной жидкости (CCF), собранной культуральной жидкости (HCCF), на любом этапе последующей обработки, на этапе лекарственного вещества (DS) или лекарственного продукта (DP), содержащего конечный составленный продукт. В некоторых других конкретных типовых вариантах реализации изобретения образец может быть отобран на любом этапе последующего процесса: осветления, хроматографической очистки, вирусной инактивации или фильтрации. В некоторых конкретных типовых вариантах реализации изобретения лекарственный продукт может быть отобран из изготовленного лекарственного продукта в ходе клинического применения, транспортировки, хранения или определенных манипуляций.

[82] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения представляющий интерес белок можно получать, например, с помощью алкилирования, восстановления, денатурации и/или расщепления.

[83] В контексте данного документа термин «средство, алкилирующее белок» относится к средству, используемому для алкилирования определенных свободных аминокислотных остатков в белке. Неограничивающими примерами средств, алкилирующих белок, являются йодацетамид (IAA), хлорацетамид (CAA), акриламид (AA), N-этилmaleимид (NEM), метилметантиосульфат (MMTS) и 4-винилпиридин или их комбинации. В типовом варианте реализации изобретения в качестве алкилирующего средства используют йодацетамид.

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

[85] В контексте данного документа термин «средство, восстанавливающее белок» относится к средству, используемому для восстановления дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающими примерами средств, восстанавливающих белок, используемых для восстановления белка, являются дитиотреитол (DTT), β-меркаптоэтанол, реактив Элмана, гидроксилamina гидрохлорид, цианоборгидрид натрия, трис-(2-карбокsetил)фосфин гидрохлорид (TCEP-HCl) или их комбинации. В типовом варианте реализации изобретения в качестве восстанавливающего средства используют DTT.

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

[87] В контексте данного документа термин «расщепляющий фермент» относится к любому из большого числа разных средств, которые могут осуществлять расщепление белка. Неограничивающие примеры гидролизующих средств, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают протеазу из *Aspergillus Saitoi*, эластазу, субтилизин, протеазу XIII, пепсин, трипсин, Труп-N, химотрипсин, аспарагиновую протеазу аспергиллов I, протеазу LysN (Lys-N), эндопротеиназу LysC (Lys-



C), эндопротеиназу Asp-N (Asp-N), эндопротеиназу Arg-C (Arg-C), эндопротеиназу Glu-C (Glu-C) или белок T наружной мембраны (OmpT), разрушающий иммуноглобулины фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), термолизин, папаин, проназу, протеазу V8 или их биологически активные фрагменты или гомологи или их комбинации. Недавний обзор, посвященный доступным методикам расщепления белков, см. в Switazar et al., "Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments" (Linda Switazar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments, 12 JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH 1067-1077 (2013)). В типовом варианте реализации изобретения в качестве расщепляющих ферментов используют трипсин и LysC.

[88] В контексте данного документа термин «жидкостная хроматография» относится к процессу, в котором биологическая/химическая смесь, переносимая жидкостью, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального разделения компонентов при их протекании насквозь (или внутрь) стационарной жидкости или твердой фазы. Неограничивающие примеры жидкостной хроматографии включают обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия или хроматографию со смешанным режимом.

[89] В контексте данного документа термин «масс-спектрометр» включает устройство, выполненное с возможностью идентификации конкретных молекулярных фрагментов и измерения их точных масс. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в который может быть элюирован полипептид или пептид для определения характеристик. Масс-спектрометр может включать три основных части: источник ионов, масс-анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры определяемого вещества могут переноситься в газовую фазу и ионизированы одновременно (как в ионизации электрораспылением) или посредством отдельных способов. Выбор источника ионов зависит от области применения. В некоторых типовых вариантах осуществления масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр. В контексте данного документа термин «тандемная масс-спектрометрия» включает методику, в которой структурную информацию о молекулах образца получают посредством применения множества этапов отбора по массе и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что молекулы образца должны быть переведены в газовую фазу и ионизированы таким образом, чтобы фрагменты образовывались предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массе. Многоступенчатая MS/MS, или  $MS^n$ , может быть осуществлена путем сначала отбора и выделения иона-предшественника ( $MS^2$ ), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона ( $MS^3$ ), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента ( $MS^4$ ) и т.д. до тех пор, пока можно получить значимую информацию или можно обнаружить сигнал фрагментного

иона. Tandemную MS успешно осуществляли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализатора для конкретного применения может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Две основные категории способов tandemной MS представляют собой «tандем в пространстве» и «tандем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «tандем во времени» соединены в пространстве или с анализаторами «tандем в пространстве». Масс-спектрометр «tандем в пространстве» включает источник ионов, устройство активации ионов-предшественников и по меньшей мере два масс-анализатора без захвата. Конкретные функции  $m/z$  разделения могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной секции прибора ионы выбирали, диссоциировали в промежуточной области, а ионы продукта затем передавали в другой анализатор для  $m/z$  разделения и сбора данных. В масс-спектрометре «tандем во времени» ионы, образующиеся в источнике ионов, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по  $m/z$  в одном и том же физическом устройстве. Идентифицированные масс-спектрометром пептиды могут использоваться в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно использовать для определения характеристик белков посредством сопоставления экспериментальных и теоретических данных MS/MS, при этом последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Указанное определение характеристик включает без ограничения секвенирование аминокислот белковых фрагментов, проведение секвенирования белка, проведение секвенирования белка *de novo*, локализацию посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

[90] В некоторых иллюстративных аспектах масс-спектрометр может работать с использованием наноэлектрораспыления или наноэлектроспрея.

[91] Термин «наноэлектрораспыление» или «наноэлектроспрей» в контексте данного документа относится к ионизации электрораспылением при очень низкой скорости потока растворителя, как правило, сотни нанолитров раствора для образца в минуту или меньше, часто без применения внешней доставки растворителя. Установка для впрыска электрораспылением, обеспечивающая наноэлектрораспыление, может использовать статический источник для наноэлектрораспыления или динамический источник для наноэлектрораспыления. Статический эмиттер для наноэлектрораспыления осуществляет непрерывный анализ небольших объемов раствора образца (аналита) в течение длительного периода времени. Динамический эмиттер для наноэлектрораспыления использует капиллярную колонку и систему подачи растворителя для хроматографического разделения смесей перед анализом с помощью масс-спектрометра.

[92] В некоторых иллюстративных аспектах масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр.

[93] В контексте данного документа термин «тандемная масс-спектрометрия» включает методику, в которой структурную информацию о молекулах образца получают посредством применения множества этапов отбора по массе и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в интактной форме, и что можно индуцировать их распад каким-либо предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массе. Многоступенчатая MS/MS, или MS<sup>n</sup>, может быть осуществлена путем сначала отбора и выделения иона-предшественника (MS<sup>2</sup>), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона (MS<sup>3</sup>), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (MS<sup>4</sup>) и т.д. до тех пор, пока можно получить значимую информацию или можно обнаружить сигнал фрагментного иона. Тандемную MS успешно осуществляли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализатора для конкретного применения может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Две основные категории способов тандемной MS представляют собой «тандем в пространстве» и «тандем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «тандем во времени» соединены в пространстве или с анализаторами «тандем в пространстве». Масс-спектрометр «тандем в пространстве» включает источник ионов, устройство активации ионов-предшественников и по меньшей мере два масс-анализатора без захвата. Конкретные функции  $m/z$  разделения могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной секции прибора ионы выбирали, диссоциировали в промежуточной области, а ионы продукта затем передавали в другой анализатор для  $m/z$  разделения и сбора данных. В масс-спектрометре «тандем во времени» ионы, образующиеся в источнике ионов, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по  $m/z$  в одном и том же физическом устройстве.

[94] Идентифицированные масс-спектрометром пептиды могут использоваться в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно использовать для определения характеристик белков посредством сопоставления экспериментальных и теоретических данных MS/MS, при этом последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Указанное определение характеристик включает без ограничения секвенирование аминокислот белковых фрагментов, проведение секвенирования белка, проведение секвенирования белка *de novo*, локализацию посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

[95] В контексте данного документа термин «база данных» относится к скомпилированной коллекции белковых последовательностей, которые могут существовать в образце, например, в форме файла в формате FASTA. Соответствующие белковые последовательности могут быть получены из последовательностей кДНК изучаемого вида. Общедоступные базы данных, которые можно использовать для поиска

соответствующих белковых последовательностей, включают базы данных, размещенные, например, на Uniprot или Swiss-prot. Поиск в базах данных может осуществляться с использованием средств, называемых в данном документе «биоинформатическими средствами». Биоинформатические средства обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров MS/MS по всем возможным последовательностям в базе данных (базах данных) и предоставляют интерпретированные (аннотированные) спектры MS/MS в качестве выходных данных. Неограничивающими примерами таких средств являются Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), Spectrum Mill ([www.chem.agilent.com](http://www.chem.agilent.com)), PLGS ([www.waters.com](http://www.waters.com)), PEAKS ([www.bioinformaticssolutions.com](http://www.bioinformaticssolutions.com)), Protein Pilot ([download.appliedbiosystems.com/proteinpilot](http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot)), Phenyx ([www.phenyx-ms.com](http://www.phenyx-ms.com)), Sorcerer ([www.sagenresearch.com](http://www.sagenresearch.com)), OMSSA ([www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/)), X!Tandem ([www.thegpm.org/TANDEM/](http://www.thegpm.org/TANDEM/)), Protein Prospector ([prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm](http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm)), Byonic ([www.proteinmetrics.com/products/byonic](http://www.proteinmetrics.com/products/byonic)) или Sequest ([fields.scripps.edu/sequest](http://fields.scripps.edu/sequest)).

[96] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

[97] В некоторых типовых вариантах реализации изобретения масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии с режимом отслеживания множественных реакций. В более общем случае, масс-спектрометр может осуществлять анализ с помощью отслеживания выбранных реакций (SRM), включая отслеживание последовательных реакций (CRM) и отслеживание параллельных реакций (PRM).

[98] В контексте данного документа «отслеживание множественных реакций» или «MRM» относится к методу, основанному на масс-спектрометрии, который позволяет точно количественно определять малые молекулы, пептиды и белки в сложных матрицах с высокой чувствительностью, специфичностью и широким динамическим диапазоном (Paola Picotti & Ruedi Aebersold, Selected reaction monitoring-based proteomics: workflows, potential, pitfalls and future directions, 9 NATURE METHODS 555-566 (2012)). MRM, как правило, можно осуществлять с помощью тройных квадрупольных масс-спектрометров, причем иона-предшественник, соответствующий отобранным малым молекулам/пептидам, отбирается в первом квадрупольном масс-спектрометре, а фрагментный ион иона-предшественника отбирается для отслеживания в третьем квадрупольном масс-спектрометре (Yong Seok Choi et al., Targeted human cerebrospinal fluid proteomics for the validation of multiple Alzheimers disease biomarker candidates, 930 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 129-135 (2013)).

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

множественных реакций).

[100] В контексте данного документа термин «масс-анализатор» включает устройство, способное разделять фрагменты, то есть атомы, молекулы или кластеры, по их массе. Неограничивающие примеры масс-анализаторов, которые можно использовать, представляют собой времяпролетный (TOF), магнитоэлектрический сектор, квадрупольный масс-фильтр (Q), квадрупольную ионную ловушку (QIT), орбитальную ионную ловушку, масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием (FTICR), а также методику масс-спектрометрии с ускорителем (AMS).

[101] Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается какими-либо из вышеуказанных представляющего(представляющих) интерес белка(белков), антитела(антител), образца(образцов), способа(способов) или системы(систем) жидкостной хроматографии, масс-спектрометра(масс-спектрометров), алкилирующего(алкилирующих) средства(средств), восстанавливающего(восстанавливающих) средства(средств), расщепляющего(расщепляющих) фермента(ферментов), базы данных(баз данных) или биоинформатического средства(биоинформатических средств), и любое из представляющего(представляющих) интерес белка(белков), антитела(антител), образца(образцов), способа(способов) или системы(систем) жидкостной хроматографии, масс-спектрометра(масс-спектрометров), алкилирующего(алкилирующих) средства(средств), восстанавливающего(восстанавливающих) средства(средств), расщепляющего(расщепляющих) фермента(ферментов), базы данных(баз данных) или биоинформатического средства(биоинформатических средств) можно выбрать любыми подходящими способами.

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

### **ПРИМЕРЫ**

[103] **Протокол избирательного в отношении положения одnoreакторного диметилирования.** В данном документе описывается протокол избирательного в отношении положения одnoreакторного диметилирования. Получали 100 мкг очищенного белка. Белок денатурировали в 10 мкл (10 мкг/мкл) 8 М мочевины при 50°C в течение 10 минут. Образец охлаждали. Добавляли смесь для реакции диметилирования, содержащую 2,5 мкл 8 М мочевины, содержащей 5% уксусную кислоту, 300 мМ HCHO и 120 мМ NaBH<sub>3</sub>CN, и реакция протекала в течение 15 минут при 37 °C. Добавляли 2,5 мкл 8 М мочевины, содержащей 2,5% NH<sub>2</sub>OH, для остановки реакции диметилирования, и инкубировали смесь в течение 15 минут при 37 °C.

[104] Затем белок восстанавливали путем добавления 2,5 мкл 8 М мочевины в 0,4 М Tris, уровень pH 7,5, с 20 мМ дитиотреитолом (DTT), и инкубировали при 37°C в течение 15 минут. Белок алкилировали и расщепляли путем добавления 2,5 мкл 125 мМ йодацетамида (IAA) и 2 мкл 0,5 мкг/мкл rLys-C (соотношение субстрата и фермента 100) и

инкубировали в темноте при 37°C в течение 15 минут. После этого для разбавления образца добавляли 160 мкл 0,1 М Tris, уровень pH 7,5, и добавляли 10 мкл трипсина 0,5 мкг/мкл (соотношение субстрата и фермента 20) для дополнительного расщепления, и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. В каждый образец добавляли 3,5 мкл 5,75 мЕд/мкл PNGase F (соотношение субстрата и фермента 5 по массе), и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Наконец, добавляли 2 мкл 10% муравьиной кислоты (FA) для остановки расщепления перед LC-MS-анализом.

[105] **Дополнительно оптимизированный протокол.** Был разработан дополнительно оптимизированный протокол избирательного в отношении положения однореакторного диметилирования. Получали 200 мкг очищенного белка. Белок денатурировали и восстанавливали в 20 мкл (10 мкг/мкл) 8 М мочевины с 5 мМ DTT при 37°C в течение 30 минут. Белок алкилировали путем добавления 2,5 мкл 8 М мочевины, содержащей 125 мМ IAA, и инкубировали в темноте при 37°C в течение 15 минут. Добавляли смесь для реакции диметилирования, содержащую 2,5 мкл 8 М мочевины, содержащей 10% уксусную кислоту, 600 мМ HCHO и 240 мМ NaBH<sub>3</sub>CN, и реакция протекала в течение 30 минут при 37 °С. Добавляли 5 мкл 8 М мочевины, содержащей 2,5% NH<sub>2</sub>OH, для остановки реакции диметилирования, и инкубировали смесь в течение 30 минут при 37 °С.

[106] Для разбавления образца добавляли 340 мкл 0,1 М Tris, уровень pH 7,5, и добавляли 20 мкл трипсина 0,5 мкг/мкл (соотношение субстрата и фермента 20) для расщепления, и инкубировали при 37°C в течение 2 часов. В каждый образец добавляли 7 мкл 5,75 мЕд/мкл PNGase F (соотношение субстрата и фермента 5 по массе), и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Наконец, добавляли 4 мкл 10% FA для остановки расщепления перед LC-MS-анализом.

#### **Пример 1. Не избирательный в отношении положения способ с применением фильтра с границей отсечки по молекулярной массе**

[107] Был разработан новый способ секвенирования очищенных белков *de novo* с использованием подготовки образцов для диметилирования и LC-MS-анализа. С целью оптимизации условий способа тестировали и сравнивали ряд подходов. Изначальный подход тестировали, как проиллюстрировано на Фиг. 4. В этом подходе интактный белок обрабатывают реагентами для диметилирования не избирательным в отношении положения образом, что приводит к диметилированию N-концевой  $\alpha$ -аминогруппы, а также  $\epsilon$ -аминогруппы боковых цепей лизина, а затем реагенты для диметилирования удаляют с помощью замены буфера с использованием фильтра с границей отсечки по молекулярной массе (MWCO).

[108] В частности, образец подвергают денатурации с помощью мочевины и инкубируют с HCHO и NaBH<sub>3</sub>CN для диметилирования аминокрупп. Образец подвергают замене буфера с использованием фильтра 30K MWCO для удаления реагентов для диметилирования. Затем образец подвергают восстановлению цистеиновых остатков с использованием дитиотреитола (DTT) и алкилированию йодацетамидом (IAA). Белок

подвергают ферментативному расщеплению  $\gamma$ -Lys-C и трипсином и, наконец, подвергают LC-MS-анализу.

[109] Иллюстративные результаты использования этого способа для известной белковой последовательности показаны на Фиг. 5. Выход более 95% был достигнут в случае диметилирования N-концевого серина (S) для иллюстративной белковой последовательности. Было достигнуто 78% перекрытие последовательности. Как показано на масс-спектре на Фиг. 6, повышенное содержание диметилированного иммоний-иона четко наблюдалось после фрагментации в методе диссоциации, активированной соударениями при повышенной энергии (HCD).

[110] Потенциальные недостатки способа заключались в том, что неспецифическая модификация  $\epsilon$ -амин лизина может мешать ферментативному расщеплению, что приводит к образованию более длинных последовательностей и меньшему перекрытию последовательностей. Кроме того, замена буфера с помощью MWSO увеличивает время выполнения способа и приводит к потере образца, что потенциально приводит к снижению сигнала на общей хроматограмме ионов (TIC).

### **Пример 2. Избирательный в отношении положения способ с применением фильтра с границей отсечки по молекулярной массе**

[111] С целью улучшения выявления и содействия анализу N-конца белка, описанный в примере 1 способ дополнительно модифицировали. Вместо использования не избирательного в отношении положения диметилирования аминов использовали избирательное в отношении положения диметилирование, как показано на Фиг. 7. Из-за разницы в рКа  $\alpha$ -аминогруппы N-конца, по сравнению с  $\epsilon$ -аминогруппой боковых цепей лизина (примерно 8 и 10 соответственно), каждая из них предпочтительно будет вступать в химическую реакцию при разных уровнях pH. Таким образом, контролируя уровень pH реакции диметилирования с использованием добавления 1% уксусной кислоты, в частности, для достижения уровня pH ниже 3, предпочтительно можно диметилировать N-концевой амин, тогда как лизиновые остатки остаются относительно немодифицированными.

[112] Иллюстративные результаты использования этого способа для известной белковой последовательности показаны на Фиг. 8. Анализ показал, что в случае N-концевого диметилирования достигался выход 99%, тогда как по  $\epsilon$ -амину лизинов и внутренним пептидам наблюдали менее 0,1% диметилирования. Таким образом, избирательное в отношении положения диметилирование позволило значительно улучшить выявление N-концевого пептида.

### **Пример 3. Избирательный в отношении положения одnoreакторный способ**

[113] С целью повышения сигнала, достигаемого в LC-MS, и дополнительного улучшения идентификации и секвенирования N-концевых пептидов, способ согласно примеру 2 дополнительно модифицировали. Этап замены буфера с использованием MWSO замещали этапом остановки реакции с использованием добавления к смеси  $\text{NH}_2\text{OH}$  после этапа диметилирования для предупреждения дальнейших реакций

диметилирования. Отсутствие этапа замены буфера позволило уменьшить потери образца и, следовательно, повысить интенсивность сигнала.

[114] Иллюстративные результаты использования этого способа, по сравнению со способом с MWCO из примера 2, показаны на Фиг. 9. Как и в случае предыдущего способа, для N-концевого диметилирования достигался высокий выход, и по  $\epsilon$ -амину лизинов и внутренним пептидам наблюдали менее 0,1% диметилирования. Однако этот однореакторный способ показал значительное улучшение TIC-сигнала по сравнению со способом с MWCO, обеспечивая более эффективное выявление и секвенирование N-концевых пептидов.

[115] Эти и другие параметры оптимизировали для способа по данному изобретению, как показано на Фиг. 10, и они подробно описаны в разделе «Протокол избирательного в отношении положения однореакторного диметилирования» выше. Оптимальные параметры, выбранные для будущих экспериментов, включали применение 8 М мочевины для первичной денатурации белка. Что касается реакции диметилирования, выбранные оптимальные параметры включали применение 1% уксусной кислоты, 60 мМ HCHO, 24 мМ NaBH<sub>3</sub>CN, время реакции 15 минут и температуру реакции 37 °С. Что касается способа остановки реакции, выбранные оптимальные параметры включали применение NH<sub>2</sub>OH в течение 15 минут при 37 °С. Наконец, DTT был выбран в качестве восстанавливающего средства и йодацетамид в качестве алкилирующего средства.

**Пример 4. Способ валидации избирательного в отношении положения диметилирования с использованием известных белковых последовательностей**

[116] С целью валидации применения способа по данному изобретению белки с известными последовательностями подвергали N-концевому секвенированию *de novo* с использованием избирательного в отношении положения диметилирования. На Фиг. 11А проиллюстрирована структура являющегося антителом слитого белка, Ab1. Ab1 характеризуется наличием молекул, образующихся в результате основных усечений, что приводит к гетерогенности N-концов. На Фиг. 11В проиллюстрирована последовательность Ab1, включая стрелки, указывающие на сайты основного усечения, например, по <sup>10</sup>M/<sup>11</sup>Y, <sup>90</sup>T/<sup>91</sup>N и <sup>99</sup>N/<sup>100</sup>T.

[117] Ab1 подвергали N-концевому секвенированию *de novo* путем избирательного в отношении положения диметилирования, и N-концы, образующиеся в результате усечения, были успешно выявлены с использованием способа по данному изобретению. На Фиг. 11С показано выявление иммоний-иона Y, происходящего из усеченного белка <sup>10</sup>M/<sup>11</sup>Y. На Фиг. 11D показано выявление иммоний-иона D, происходящего из усеченного белка <sup>90</sup>T/<sup>91</sup>N. На Фиг. 11Е показано выявление иммоний-иона T, происходящего из усеченного белка <sup>99</sup>N/<sup>100</sup>T.

[118] Примечательно, что <sup>99</sup>N/<sup>100</sup>T также является сайтом неспецифического расщепления трипсином. Поскольку происходит реакция диметилирования, а затем ее останавливают перед расщеплением, только N-концевые амины, присутствующие перед расщеплением, являются диметилированными и образуют ионы иммония, что позволяет



различать пептидные фрагменты с аналогичной аминокислотной последовательностью, которые образуются в результате *in vivo* усечения, по сравнению с расщеплением в рамках эксперимента.

[119] Способ по данному изобретению дополнительно валидировали с использованием другого белка с известной последовательностью: стандартного моноклонального антитела NISTmAb. Примерно 99% N-концов тяжелой цепи (HC) NISTmAb блокируется пироглутаматом (pyroQ), предотвращая участие в реакции диметилирования. Блокирование N-концов pyroQ или с помощью ряда любых других модификаций является распространенной проблемой методик, в которых используется модификация свободного N-концевого амина. Однако способ по данному изобретению демонстрирует достаточно высокую чувствительность, чтобы N-концевой пептид мог быть идентифицирован даже в том случае, когда подавляющее большинство N-концов заблокированы. Иллюстративные способы и результаты анализа NISTmAb показаны на Фиг. 12, где показана успешная идентификация иммоний-иона Q тяжелой цепи и иммоний-иона D легкой цепи, несмотря на заблокированный N-конец.

**Пример 5. Пример применения N-концевого секвенирования неизвестного белка *de novo***

[120] Способ по данному изобретению использовали для секвенирования N-конца неизвестного белка *de novo*, что продемонстрировало его применимость в реальных условиях.

[121] Протеаза IdeS, происходящая из *Streptococcus pyogenes*, является доступным инструментом в разработке терапевтических антител (публикация США номер 2007/0237784 A1). IdeS специфически расщепляет IgG-антитело ниже шарнирной области, в результате чего образуются два фрагмента Fc/2 и один фрагмент F(ab')<sub>2</sub> (или Fab<sub>2</sub>). Рекombинантно модифицированная форма IdeS, имеющая His-метку, является коммерчески доступной от Genovis под названием FabRICATOR<sup>®</sup>.

[122] TIC из SEC-MS-анализа интактных молекул с использованием FabRICATOR<sup>®</sup> показана Фиг. 13А, на которой показано, что помимо основных мономерных молекул, FabRICATOR<sup>®</sup> включает тример, димер и неохарактеризованные усеченные молекулы. Genovis описывает FabRICATOR<sup>®</sup> как имеющую молекулярную массу 37725 Да. При этом предсказанная масса первоначально опубликованной последовательности IdeS составляет 36644,5 Да, как показано на Фиг. 13В. Это говорит о том, что FabRICATOR<sup>®</sup> содержит дополнительные неописанные аминокислоты по сравнению с IdeS, усечения которых потенциально может привести к появлению усеченных молекул, наблюдаемых при SEC-MS. Масс-спектры из анализа массы интактных молекул и анализ на основе картирования пептидов для FabRICATOR<sup>®</sup> показаны на Фиг. 13С и 13D соответственно. Традиционные способы на основе масс-спектрометрии не смогли обеспечить идентификацию N-концевой последовательности FabRICATOR<sup>®</sup>. Указаны неописанные возможные N-концевые последовательности, предшествующие описанной IdeS N-концевой последовательности DSFSANQEIR.

[123] С целью выполнения секвенирования неизвестной N-концевой последовательности *de novo* параллельно готовили контрольный образец и диметилированный образец. Общее количество FabRICATOR<sup>®</sup> в каждом изначальном образце составляло 10 мкг (0,05 мкг/мкл). Оба образца готовили и анализировали с использованием способа избирательного в отношении положения диметилирования, описанного выше, за исключением того, что реагенты для диметилирования не добавляли в контрольный образец. Объем вводимого в хроматограф белка в каждом образце составлял 2 мкг/40 мкл. Каждую пару пиков N-концевых последовательностей идентифицировали вручную. Диметилированный пептид отличался слегка увеличенным временем удержания для LC и увеличением массы 28 Да. Для секвенирования *de novo* каждый ион b из контрольного образца, в сравнении с диметилированным, отличался на 28 Да из-за диметилированного N-концевого остатка, тогда как каждый ион y имел одинаковую точную массу, что обеспечивало возможность легкой идентификации ионов b и y и, таким образом, четкого и эффективного секвенирования. Затем результаты подлежали перекрестной валидации с использованием дополнительных методик, включая MS интактных молекул.

[124] На Фиг. 14А показана хроматограмма N-концевого пептида 1 FabRICATOR<sup>®</sup>, на которой сравнивается контрольный и диметилированный (DiMe) пептид. Диметилированный пептид демонстрирует увеличенное время удержания. На Фиг. 14В показан соответствующий масс-спектр, на котором показано, что диметилированный N-концевой пептид имеет прогнозируемый массовый сдвиг 28 Да. На Фиг. 14С показан спектр MS/MS для N-концевого пептида 1 FabRICATOR<sup>®</sup> из контрольного образца. Первая аминокислота в последовательности в данном случае не различима, и поэтому секвенирование невозможно с использованием традиционной LC-MS/MS. При этом на Фиг. 14D показан соответствующий спектр для диметилированного образца. В данном случае диметилированный G-остаток четко виден как первая аминокислота в последовательности. При сравнении спектров на Фиг. 14С и 14D ионы b четко различимы благодаря массовому сдвигу в 28 Да, по сравнению с ионами y, которые не имеют массового сдвига в диметилированном образце. Это также указано в таблице ионов b и y под каждым спектром. С использованием способа по данному изобретению было идентифицировано, что N-концевой пептид 1 FabRICATOR<sup>®</sup> имеет последовательность GQQMGR.

[125] Аналогичный процесс повторяли для дополнительных N-концевых пептидов FabRICATOR<sup>®</sup>. Как показано на Фиг. 15А-С, N-концевой пептид 2 секвенировали и идентифицировали как GGQQMGR. Как показано на Фиг. 16А-С, N-концевой пептид 3 секвенировали и идентифицировали как SMTGGQQMGR. Как показано на Фиг. 17А-С, N-концевой пептид 4 секвенировали и идентифицировали как ASMTGGQQMGR. Как показано на Фиг. 18А-С, N-концевой пептид 5 секвенировали и идентифицировали как DPL(I)ADSFANQEIR. Как показано на Фиг. 19А-С, N-концевой пептид 6 секвенировали и идентифицировали как RPDL(I)ADSFANQEIR. Во всех случаях способ по данному

изобретению обеспечивал возможность эффективного мечения и идентификации N-концевого пептида и N-концевого аминокислотного остатка, что в свою очередь обеспечивало возможность идентификации ионов b и последующего секвенирования аминокислот.

[126] Результаты секвенирования N-конца FabRICATOR<sup>®</sup> представлены на Фиг. 20А, где показана основная N-концевая последовательность, идентифицированная согласно данному документу, и ее относительное положение относительно описанной N-концевой последовательности IdeS. N-концевая последовательность MASMTGGQMG была идентифицирована как эпитопная метка T7, происходящая из основного капсидного белка T7 гена T7. T7-метка часто присоединяется к N-концу или С-концу представляющего интерес белка для облегчения анализа белка с использованием иммунохимических способов. Кроме того, менее распространенная N-концевая последовательность, идентифицированная с использованием этого способа, представлена на Фиг. 20В.

[127] Полная последовательность FabRICATOR<sup>®</sup>, включая основную и менее распространенную N-концевые последовательности, обнаруженные согласно данному документу, показана на Фиг. 20С. Полная последовательность FabRICATOR<sup>®</sup> с основной N-концевой последовательностью имеет прогнозируемую молекулярную массу 37725,4 Да, соответствующую описанной молекулярной массе FabRICATOR<sup>®</sup> 37725 Да. Идентифицированные N-концевые последовательности дополнительно валидировали с помощью применения масс-спектрометрии интактных молекул, при этом иллюстративный масс-спектр показан на Фиг. 20D. В данном документе аннотированы различные молекулы FabRICATOR<sup>®</sup> с общими массами, соответствующими вариантам, содержащим идентифицированные N-концевые последовательности.

[128] Перекрытие последовательностей FabRICATOR<sup>®</sup> из вышеописанного анализа можно увидеть при сравнении контрольного образца (Фиг. 20Е) с диметилированным образцом (Фиг. 20F). Диметилирование обеспечивает возможность превосходной идентификации N-концевых пептидов, по сравнению с контролем, и четкой демаркации распространенных сайтов усечения в N-концевой T7-метке, с воспроизведением эффективности способа по данному изобретению в выявлении сайтов усечения, как показано в примере 4.

[129] Описанный в данном документе способ обеспечивает эффективную методику N-концевого секвенирования *de novo* с минимальным дополнительным временем (около 30 минут) или усложнением при добавлении к традиционному протоколу картирования пептидов. Секвенирование с использованием избирательного в отношении положения однореакторного диметилирования значительно улучшало интенсивность сигнала N-концевых пептидов, демонстрировало высокую эффективность мечения, обеспечивало идентификацию сайтов усечения, позволяло секвенировать даже предварительно заблокированные N-концы, обеспечивало различение между сайтами усечения *in vivo* и сайтами ферментативного расщепления, и для него было показано точное секвенирование

неизвестного N-конца, которое согласуется с результатами масс-спектрометрии интактных молекул.

[130] Предусматривается дополнительная оптимизация способа согласно данному документу. Например, эффективность мечения дополнительно повышалась с использованием избирательного в отношении положения диметилирования после этапов восстановления и алкилирования. Иллюстративные экспериментальные параметры показаны на Фиг. 21А (ср. Фиг. 10), при этом была продемонстрирована эффективность мечения 99,1%. Этот протокол подробно описан в разделе «Дополнительно оптимизированный протокол» выше.

[131] Дополнительным способом оптимизации является сбор данных MS/MS, запускаемый иммоний-ионами. Образующийся в HCD-MS/MS иммоний-ион можно идентифицировать с помощью прибора в режиме реального времени с целью идентификации N-концевой последовательности и соответствующей адаптации метода фрагментации. Сбор данных MS/MS, запускаемый иммоний-ионами, может упростить анализ данных. Иллюстративная схема автоматизированной идентификации иммоний-иона показана на Фиг. 21В.

[132] Хотя конкретные реагенты, аналиты и параметры способа описаны как примеры выше, следует понимать, что способ по данному изобретению не ограничивается этими примерами и может применяться с использованием целого ряда реагентов, аналитов или параметров способа, как определено специалистом в данной области техники.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ определения аминокислотной последовательности N-концевого домена представляющего интерес белка, включающий:

(а) приведение образца, включающего представляющий интерес белок, в контакт с по меньшей мере одним реагентом для диметилирования с образованием смеси для диметилирования;

(b) приведение указанной смеси для диметилирования в контакт с по меньшей мере одним реагентом для остановки реакции с образованием смеси с остановленной реакцией;

(с) подвергание указанной смеси с остановленной реакцией анализу на основе жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией, причем в указанном анализе ионизируется по меньшей мере один диметилированный аминокислотный остаток с образованием по меньшей мере одного иммоний-иона;

(d) идентификацию по меньшей мере одного N-концевого пептида исходя из присутствия указанного по меньшей мере одного иммоний-иона; и

(е) сравнение масс-спектра указанного по меньшей мере одного N-концевого пептида из (d) с масс-спектром соответствующего по меньшей мере одного N-концевого пептида недиметилированного контрольного образца для определения аминокислотной последовательности N-концевого домена указанного представляющего интерес белка,

причем указанный по меньшей мере один реагент для диметилирования из (а) приводят в контакт в условиях, которые предпочтительно приводят к диметилированию N-концевого  $\alpha$ -амин.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный представляющий интерес белок представляет собой антитело, биспецифическое антитело, моноклональное антитело, слитый белок, конъюгат антитела и лекарственного средства, фрагмент антитела или белковый лекарственный препарат.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один реагент для диметилирования выбран из группы, состоящей из  $\text{HCHO}$ ,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ , их тяжелых изотопов и их комбинации.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная смесь для диметилирования имеет уровень pH ниже 3.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная смесь для диметилирования включает уксусную кислоту.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная смесь для диметилирования имеет температуру от около  $20^\circ\text{C}$  до около  $37^\circ\text{C}$ .

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную смесь для диметилирования инкубируют в течение от около 5 минут до около 1 часа.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный реагент для остановки реакции выбран из группы, состоящей из  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NH}_2\text{OH}$  и их комбинации.

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная смесь с остановленной реакцией имеет температуру от около  $20^\circ\text{C}$  до около  $37^\circ\text{C}$ .

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную смесь с остановленной реакцией инкубируют в течение от около 5 минут до около 1 часа.

11. Способ по п. 1, дополнительно включающий приведение указанного образца и/или указанной смеси с остановленной реакцией в контакт с по меньшей мере одним расщепляющим ферментом.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один расщепляющий фермент выбран из группы, состоящей из трипсина, химотрипсина, LysC, LysN, AspN, GluC, ArgC и их комбинации.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная жидкостная хроматография включает обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, хроматографию гидрофильного взаимодействия, хроматографию со смешанным режимом или их комбинацию.

14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная система жидкостной хроматографии соединена с указанным масс-спектрометром.

15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр представляет собой масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометр с ионизацией нанозлектрораспылением или тройной квадрупольный масс-спектрометр.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный масс-спектрометр способен осуществлять отслеживание множественных реакций или отслеживание параллельных реакций.

17. Способ по п. 1, дополнительно включающий приведение указанного образца и/или указанной смеси с остановленной реакцией в контакт с по меньшей мере одним алкилирующим средством.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что указанное алкилирующее средство представляет собой йодацетамид.

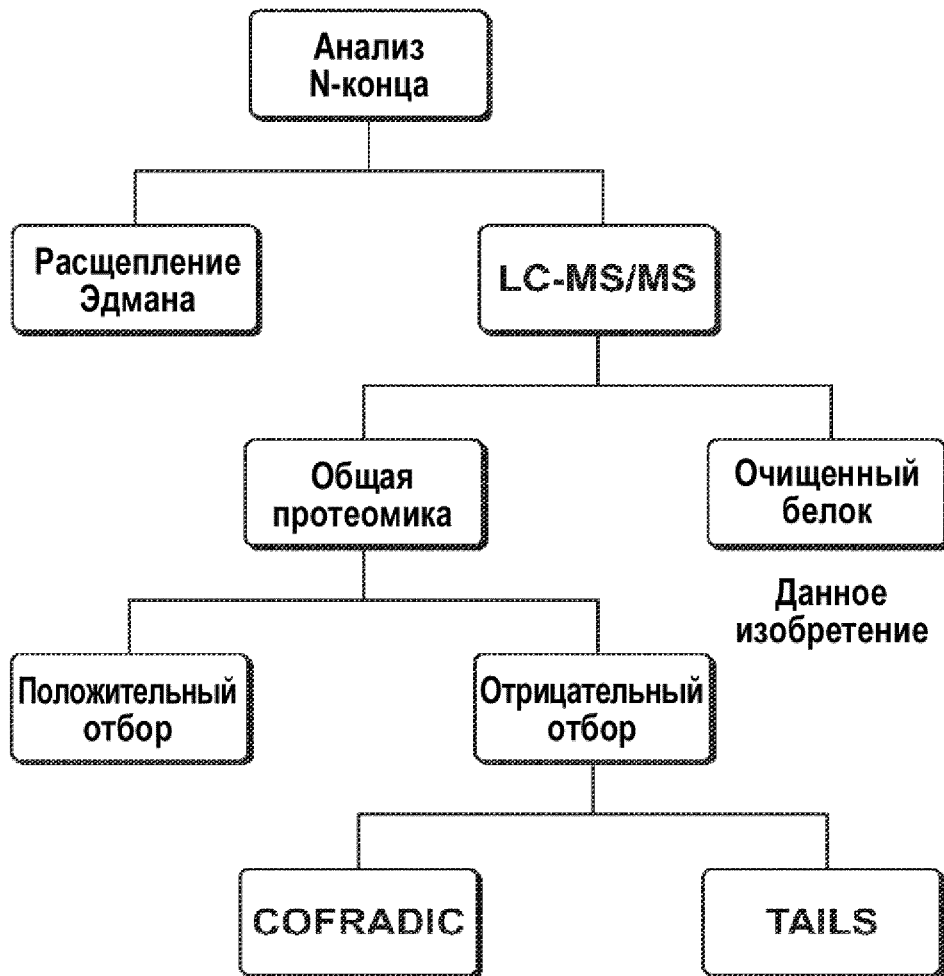
19. Способ по п. 1, дополнительно включающий приведение указанного образца и/или указанной смеси с остановленной реакцией в контакт с по меньшей мере одним восстанавливающим средством.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что указанное восстанавливающее средство представляет собой дитиотреитол.

21. Способ по п. 1, дополнительно включающий приведение указанного образца в контакт с по меньшей мере одним денатурирующим средством.

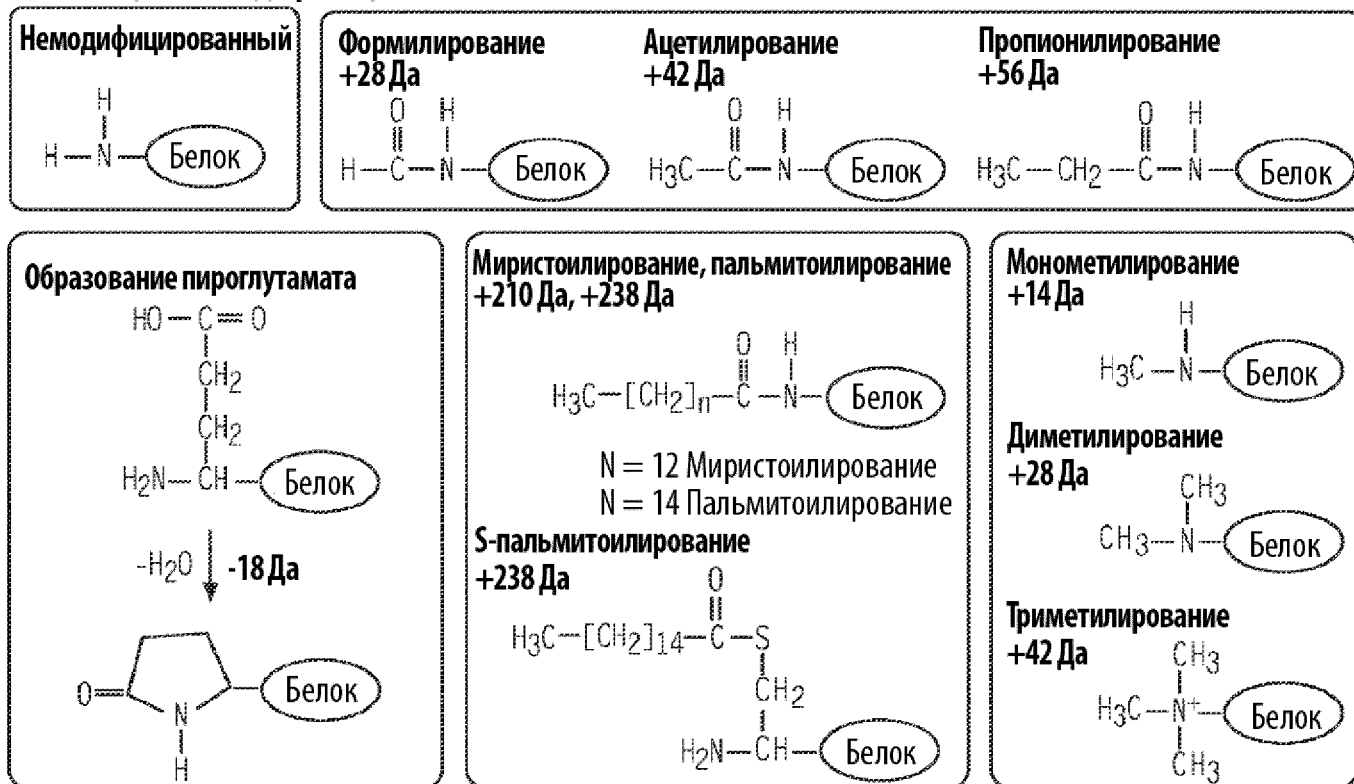
22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что указанное денатурирующее средство представляет собой мочевины.

По доверенности



Фиг. 1

**а) N-концевые модификации**



**б) C-концевые модификации**

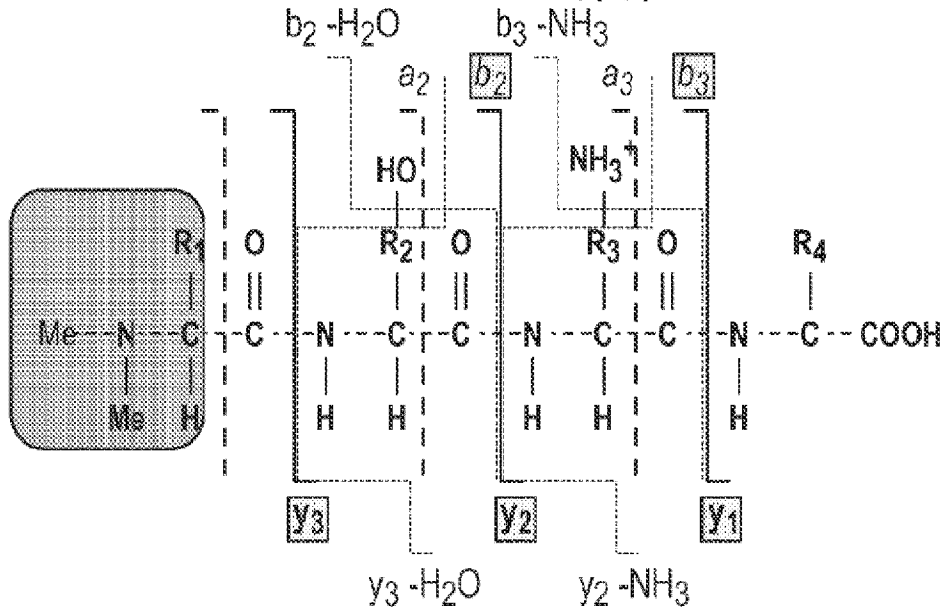


ACS chemical biology, 2015, 10, 1754-1764.

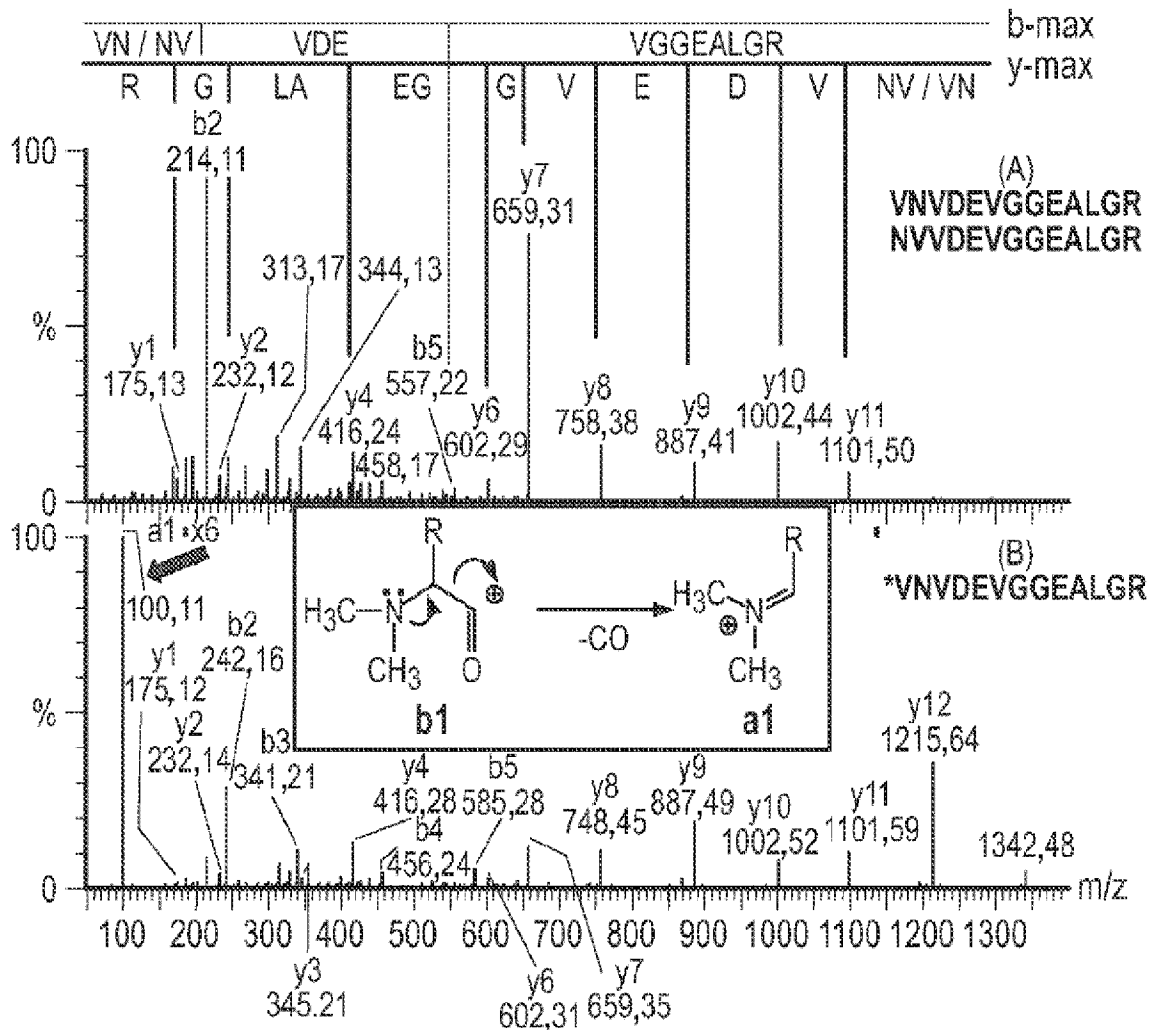
Фиг. 2



**Иммоний-ион (a1)**

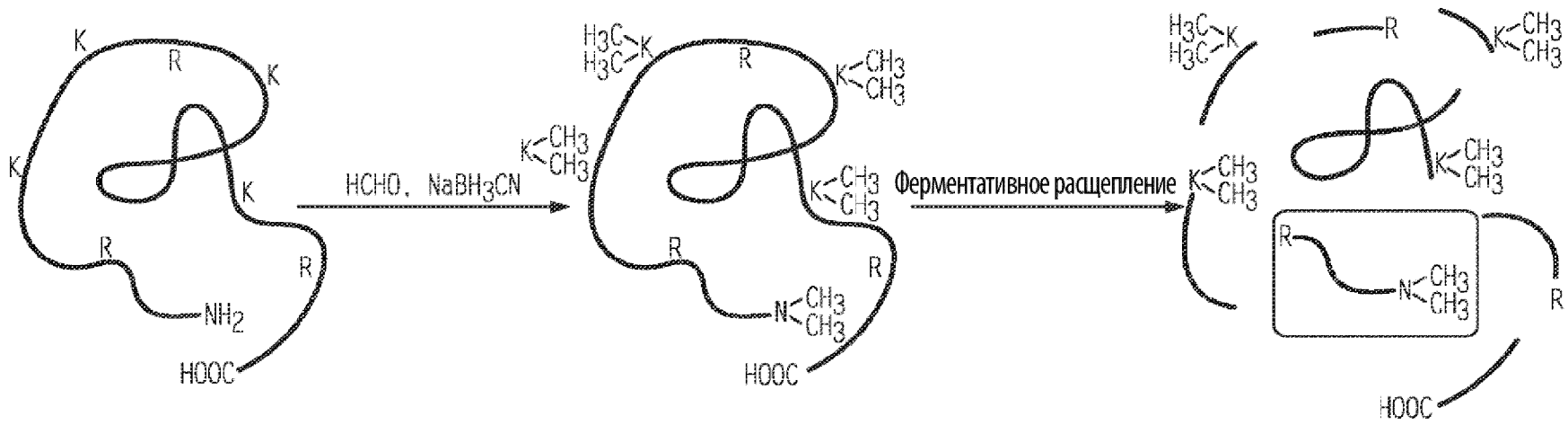


*Analytical Chemistry*, 2018, 90, 10664-10669.



*Journal of Proteome Research*. 2005.

Фиг. 3



Диметилирование по N-концу и боковой цепи лизина

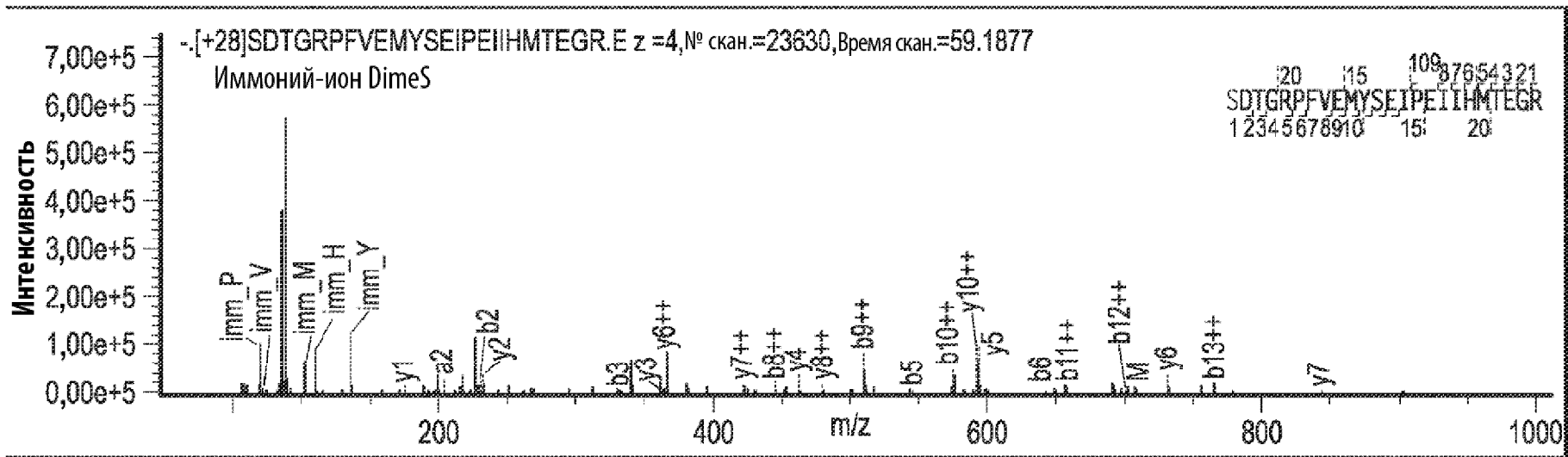
Фиг. 4

Не избирательное в отношении положения диметилирование, 78% перекрытие последовательности

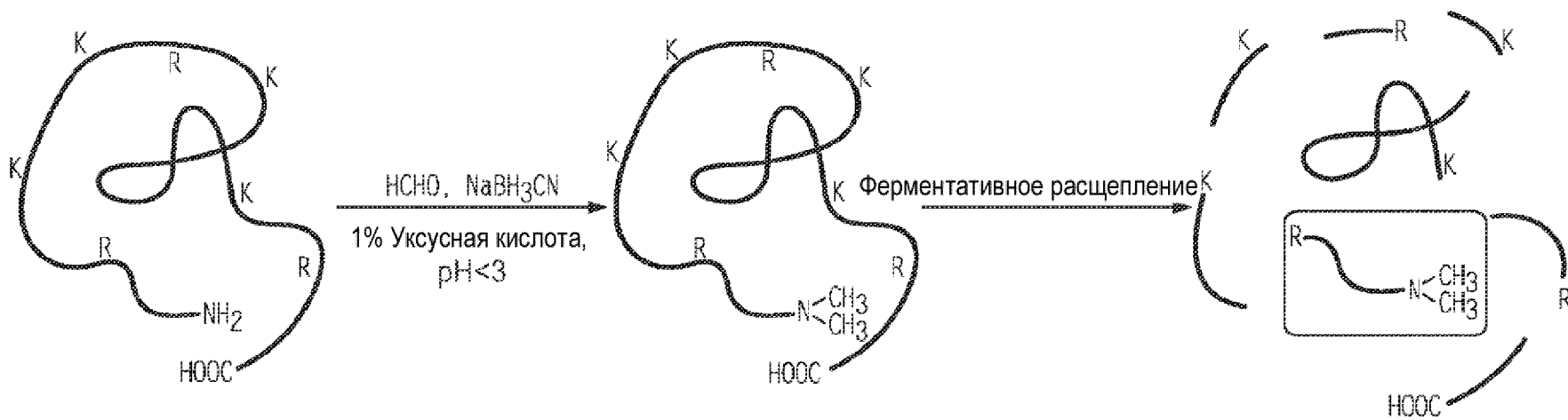
10	20	30	40	50	60	70	80	90	100																																																																																								
S	D	T	G	R	P	F	V	E	M	Y	S	E	I	P	E	I	H	M	T	E	G	R	E	L	V	I	P	C	R	V	T	S	P	N	I	T	V	T	L	K	K	F	L	D	T	L	I	P	D	G	K	R	I	I	W	D	S	R	K	G	F	I	I	S	N	A	T	Y	K	E	I	G	L	L	T	C	E	A	T	V	N	G	H	L	Y	K	T	N	Y	L	T	H	R	Q	T	N	T
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200																																																																																								
I	I	D	V	L	S	P	S	H	G	I	E	L	S	V	G	E	K	L	V	L	N	C	T	A	R	T	E	L	N	V	G	I	D	F	N	W	E	Y	P	S	S	K	H	Q	H	K	L	V	N	R	D	L	K	T	Q	S	G	S	E	M	K	K	F	L	S	T	L	I	D	G	V	T	R	S	D	O	G	L	Y	T	C	A	A	S	S	G	L	M	T	K	K	N	S	T	F	V	
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300																																																																																								
R	V	H	E	K	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	D	G	V	E	V	I	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400																																																																																								
G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	M	S	N	Q	P	E	N	N	Y	K	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S		
410	420	430																																																																																															
R	W	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K																																																																			

5/32

Фиг. 5

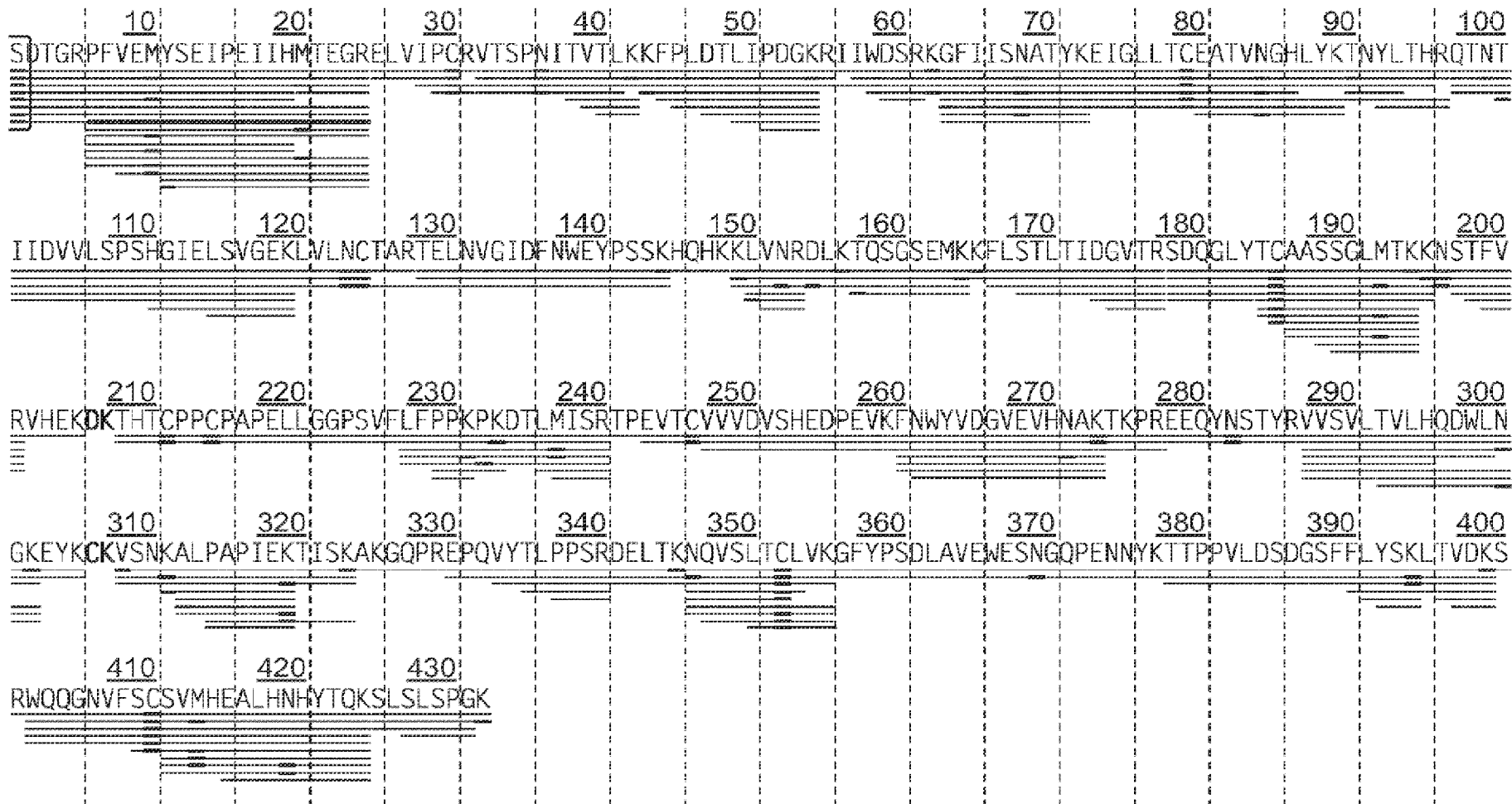


Фиг. 6



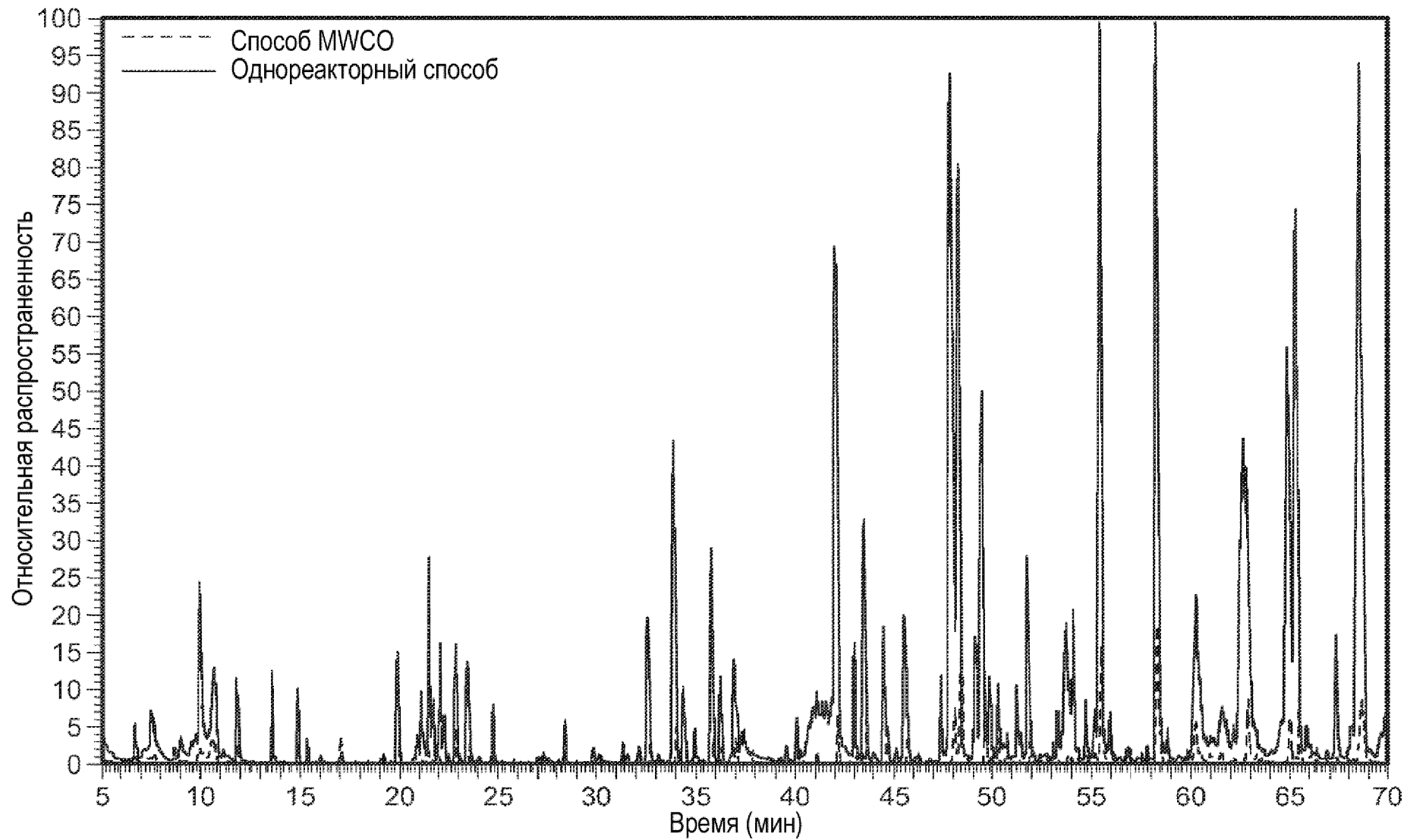
Избирательное в отношении положения диметилирование по N-концу белка

Фиг. 7



8/32

Фиг. 8

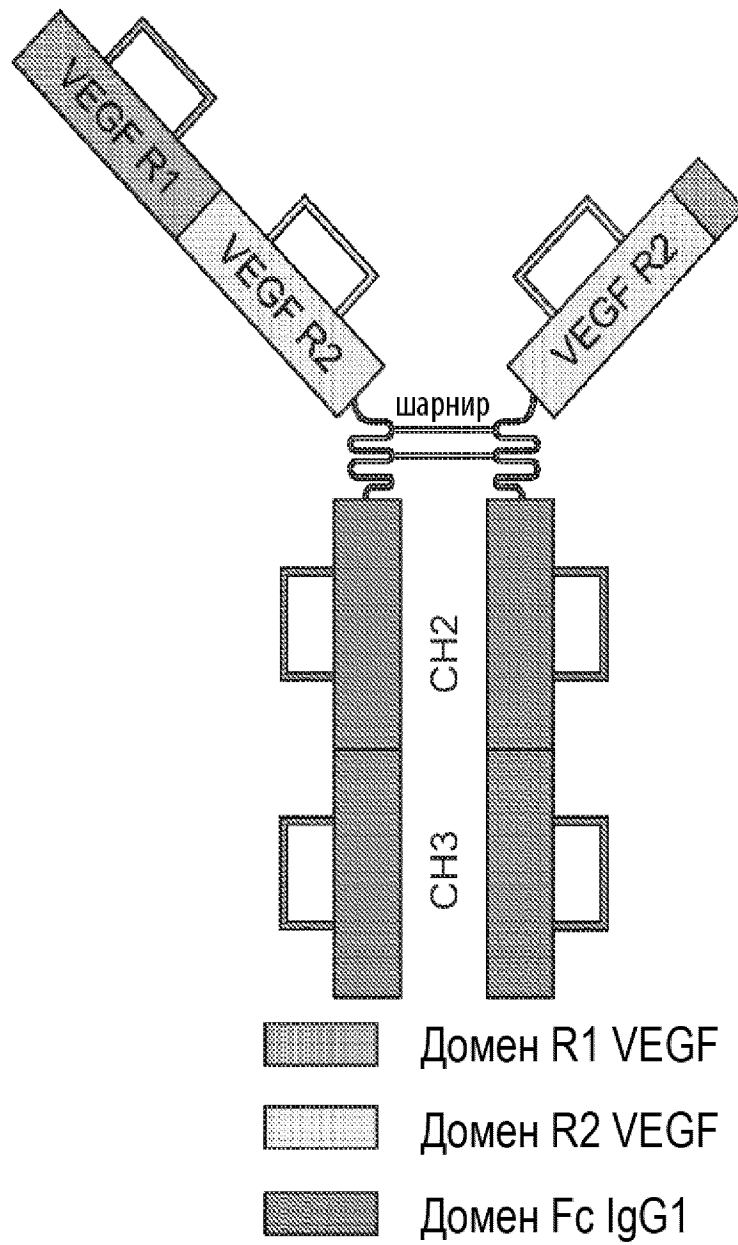


Фиг. 9

Ab1	Способ	Уксусная кислота	HCHO	NaBH <sub>3</sub> CN	Время реакции	Температура реакции	Остановка реакции	Время остановки реакции	Температура остановки реакции	Эффективность мечения -SDT
MWCO	MWCO	1%	60 мМ	24 мМ	10 мин	R.T	NH <sub>3</sub>	5 мин	R.T	99,6%
20 мМ HCHO	R.T, 10 мин	1%	20 мМ	10 мМ	10 мин	R.T	NH <sub>2</sub> OH	10 мин	R.T	38,8%
	R.T, 60 мин	1%	20 мМ	10 мМ	1 ч	R.T	NH <sub>2</sub> OH	1 ч	R.T	85,9%
10 мМ NaBH <sub>3</sub> CN	37°C, 60 мин	1%	20 мМ	10 мМ	1 ч	37°C	NH <sub>2</sub> OH	1 ч	37°C	90,1%
60 мМ HCHO	37°C, 15 мин	1%	60 мМ	24 мМ	15 мин	37°C	NH <sub>2</sub> OH	15 мин	37°C	98,4%
24 мМ NaBH <sub>3</sub> CN	37°C, 30 мин	1%	60 мМ	24 мМ	30 мин	37°C	NH <sub>2</sub> OH	30 мин	37°C	97,1%

Фиг. 10





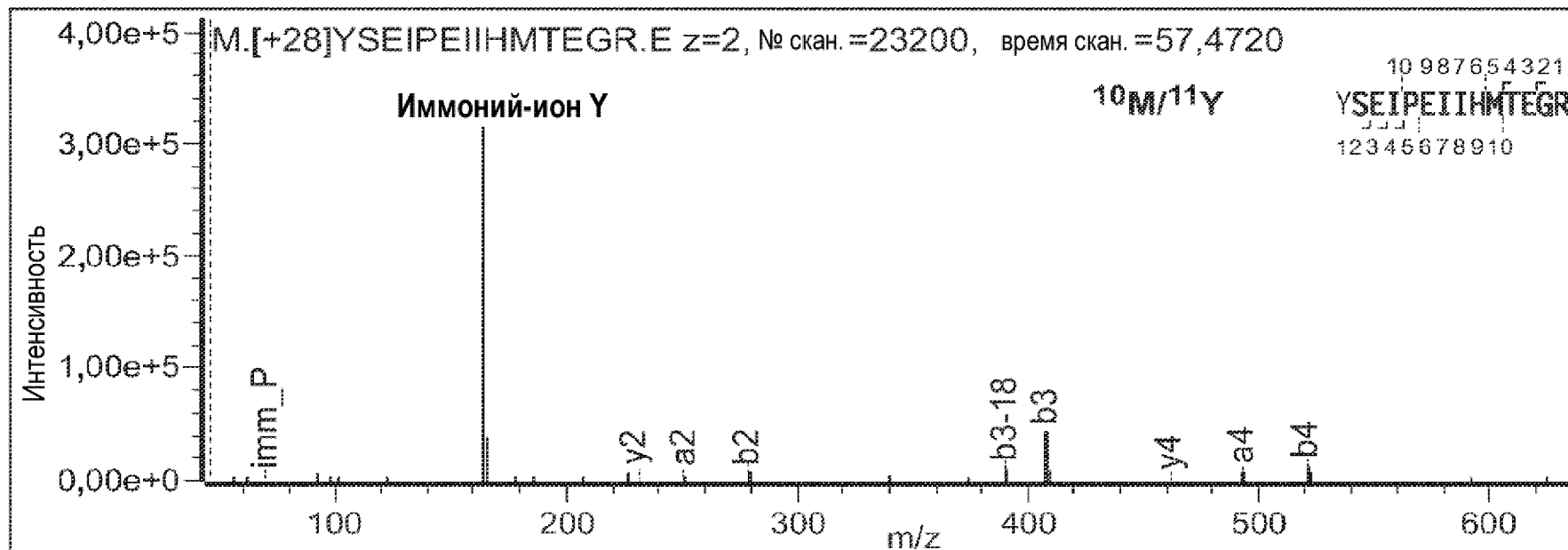
Сайты N-сцепленного гликозилирования  
(N36, N68, N123, N196, N282)

Фиг. 11А

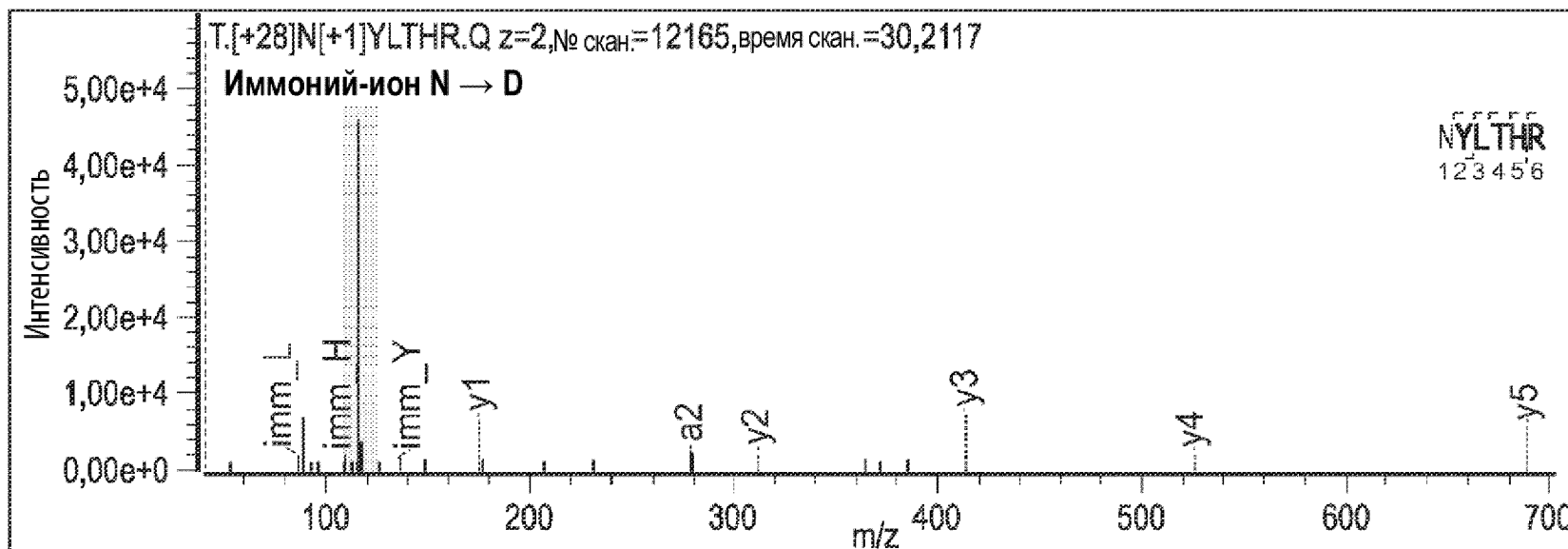
SDTGRPFVEM YSEIPEIIHM TEGRELVIPC RVTSPNITVT LKKFPLDTLI PDGKRIIWDS RKGFIISNAT YKEIGLLTCE<sup>80</sup>  
 ATVNGHLYKT NYLTHROTNT IIDVVLSPSH GIELSVGEKL VLNCTARTEL NVGIDFNWEY PSSKHQHKKL VNRDLKTQSG<sup>160</sup>  
 SEMKKFLSTL TIDGVTRSDQ GLYTCAASSG LMTKKNSTFV RVHEKDKTHT CPPCPAPEL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR<sup>240</sup>  
 TPEVTCVVVD VSHEDPEVK NYYVDGVEVF NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHDDWLN GKEYKCKVSN KALPAPTEKT<sup>320</sup>  
 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNOVSL TCLVKGFPYS DIAVEWESNG OPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS<sup>400</sup>  
 RWCOGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSELSLSP GK<sup>432</sup>

Межцепочечные дисульфидные связи

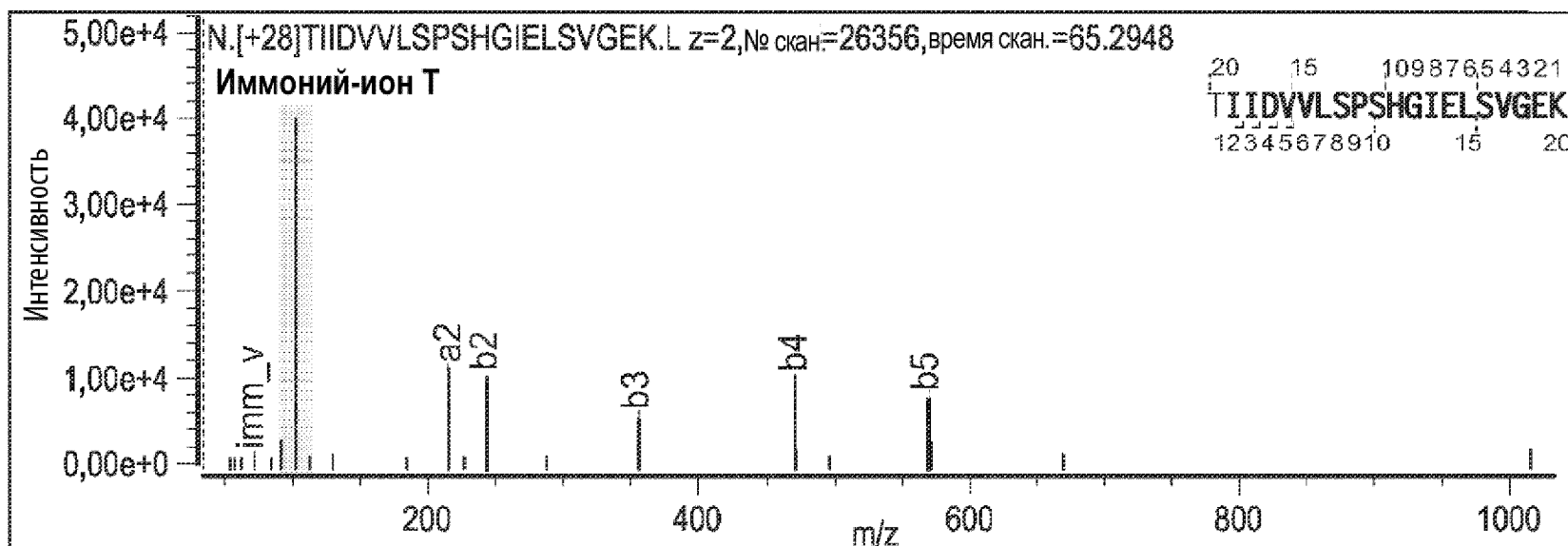
Фиг. 11В



Фиг. 11С

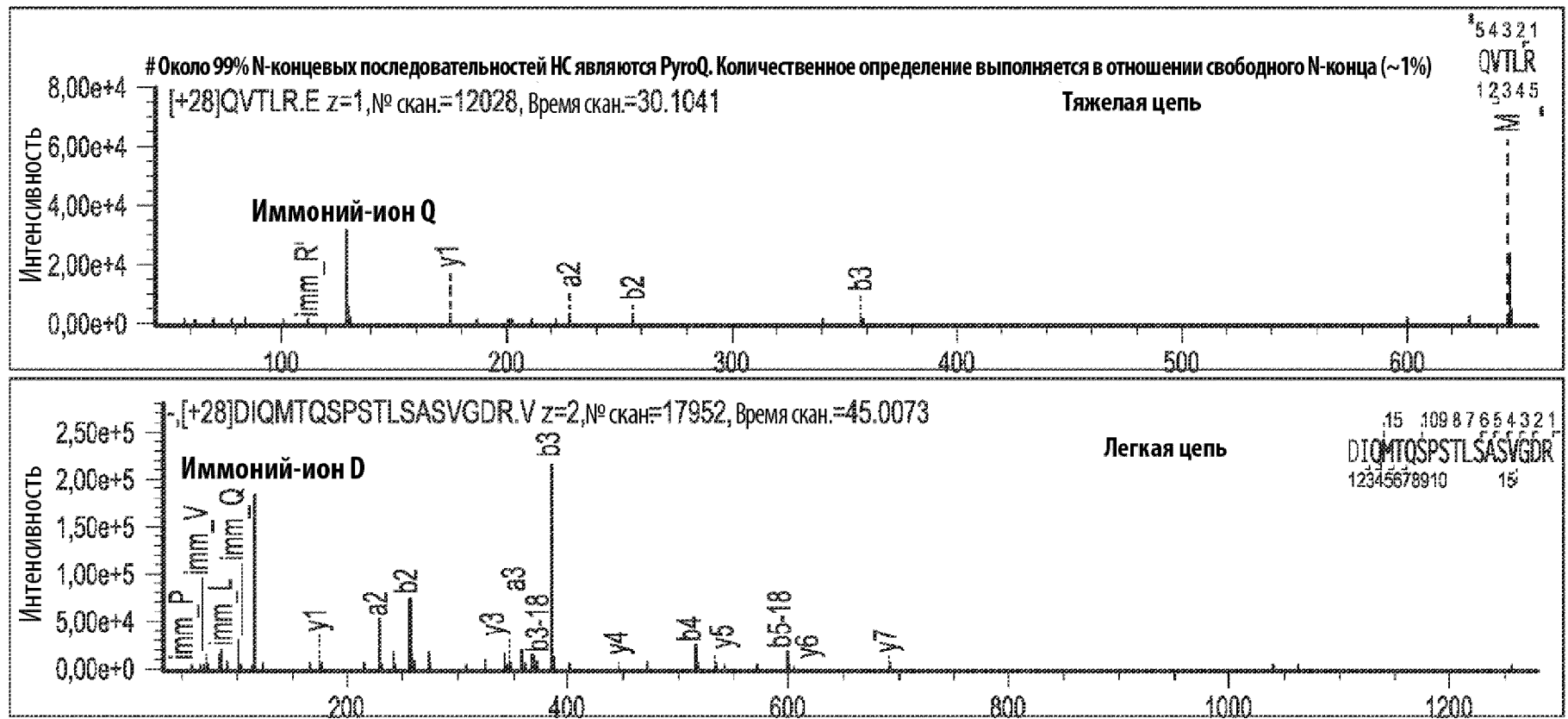


Фиг. 11D



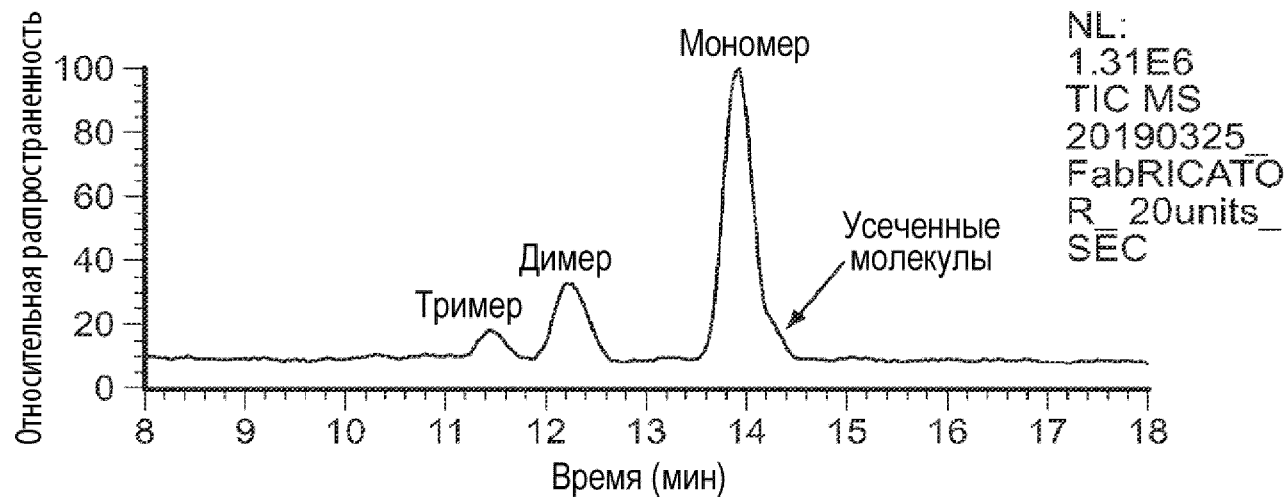
Фиг. 11E

Белок	Уксусная кислота	HCHO	NaBH <sub>3</sub> CN	Время реакции	Температура реакции	Остановка реакции	Время остановки реакции	Температура остановки реакции	Эффективность мечения HС*	Эффективность мечения LC
NISTmAb	1%	60 мМ	24 мМ	30 мин	37 °С	NH <sub>2</sub> OH	30 мин	37 °С	> 99%	74%



14/32

Фиг. 12



Фиг. 13А

IdeS из патентной заявки:

Средняя масса = 35762,9837 Моноизотопная масса = 35740,7970  
 N-конец = H, C-конец = OH

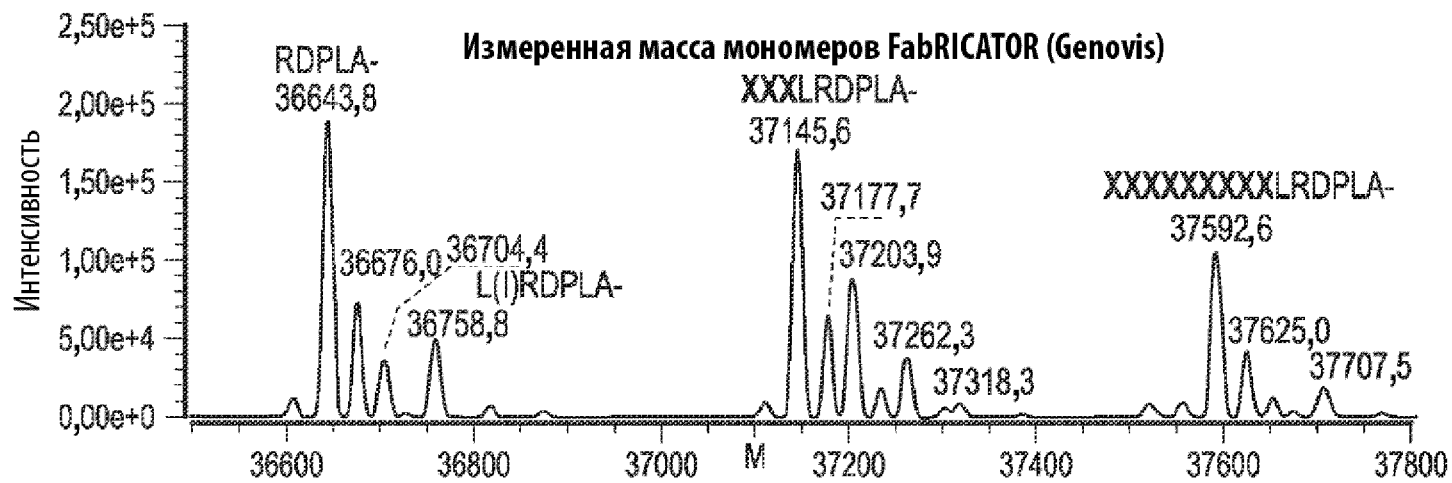
```

1 DSFSA NQEIR YSEVT PYHVT SVWTK GVTTP ANFTQ GEDVF HAPYV ANQGW
51 YDITK TFNGK DDLLC GAATA GNMLH WWFDQ NKDQI KRYLE EHPEK QKINF
101 NGEQM FDVKE AIDTK NHQLD SKLFE YFKEK AFPYL STKHL GVFPD HVIDM
151 FINGY RLSLT NHGPT PVKEG SKDPR GGIFD AVFTR GDQSK LLTSR HDFKE
201 KNLKE ISDLI KKELT EGKAL GLSHT YANVR INHVI NLWGA DFDSN GNLKA
251 IYVTD SDSNA SIGMK KYFVG VNSAG KVAIS AKEIK EDNIG AQVLG LFTLS
301 TGQDS WNQTN HHHHH H
  
```

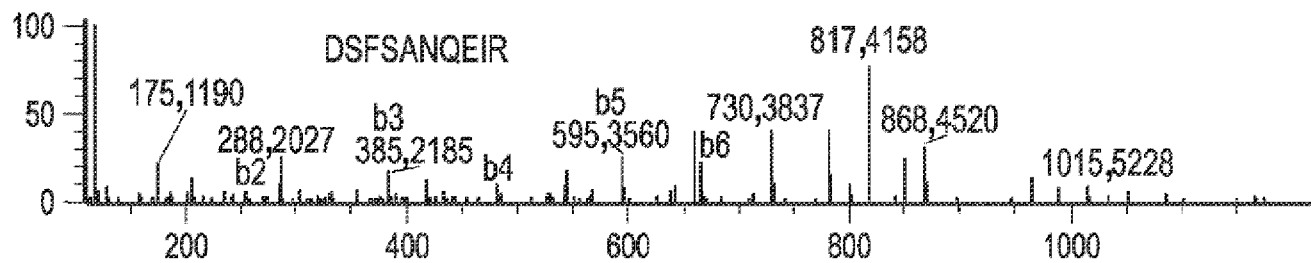
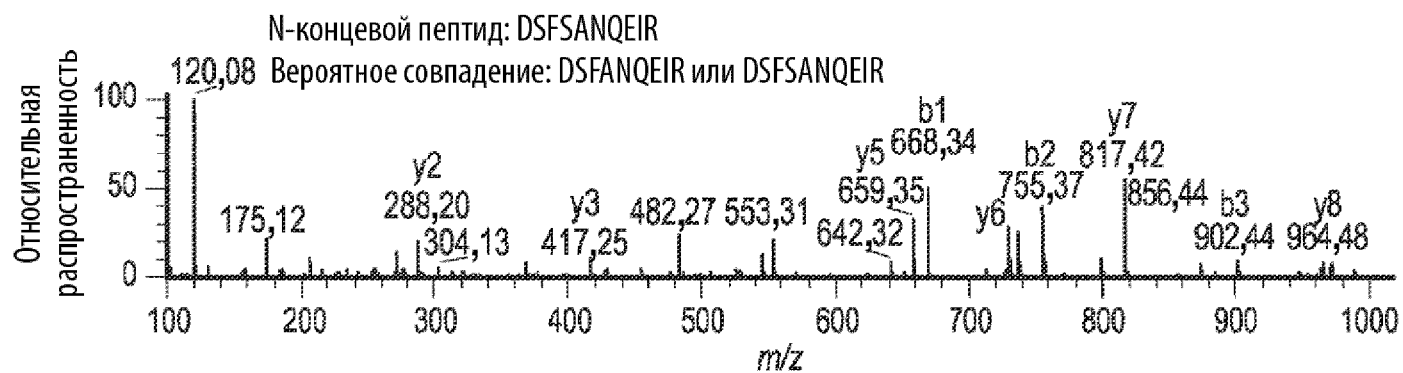
Прогнозируемая масса: 35763,0 + 552,3 + 329,2 = 36644,5 Да

N-конец C-конец

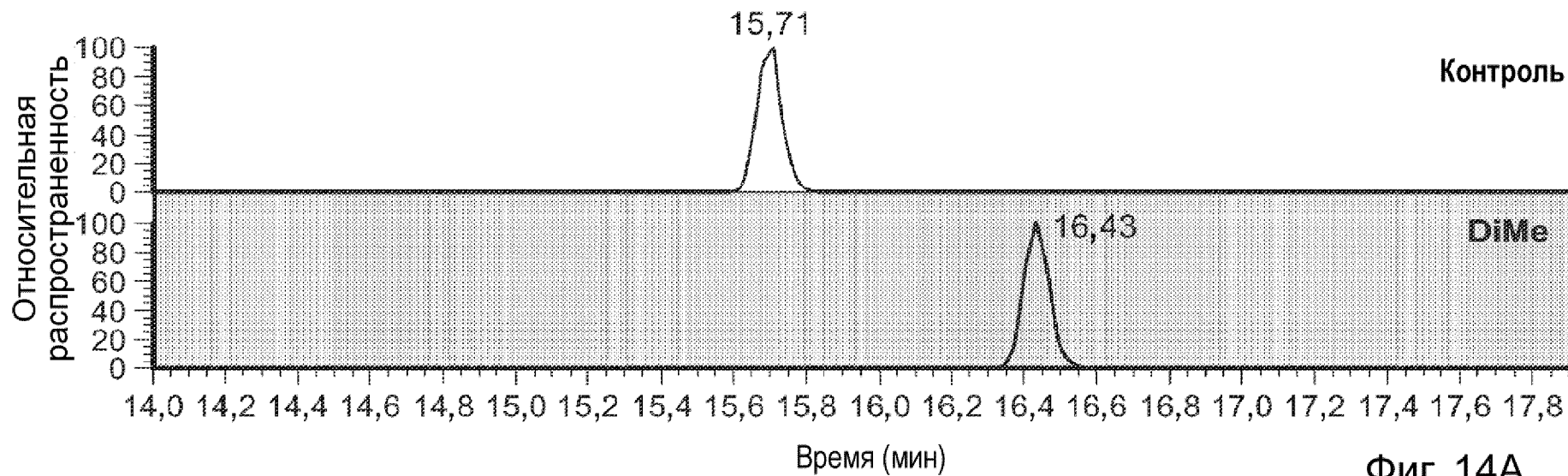
Фиг. 13В



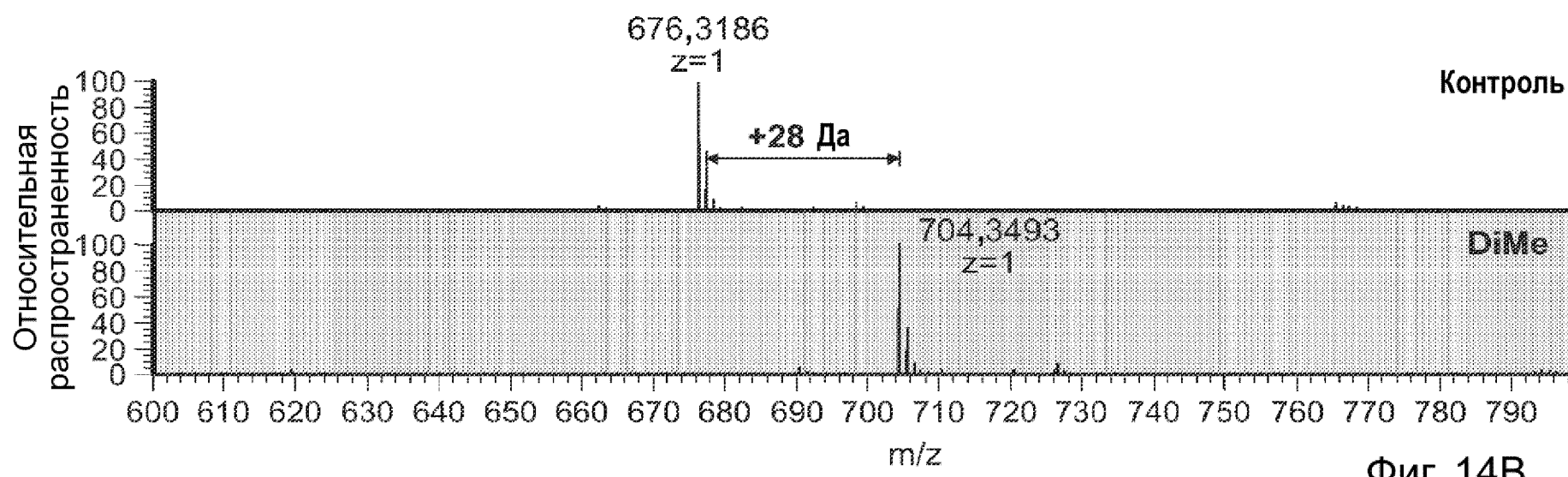
Фиг. 13С



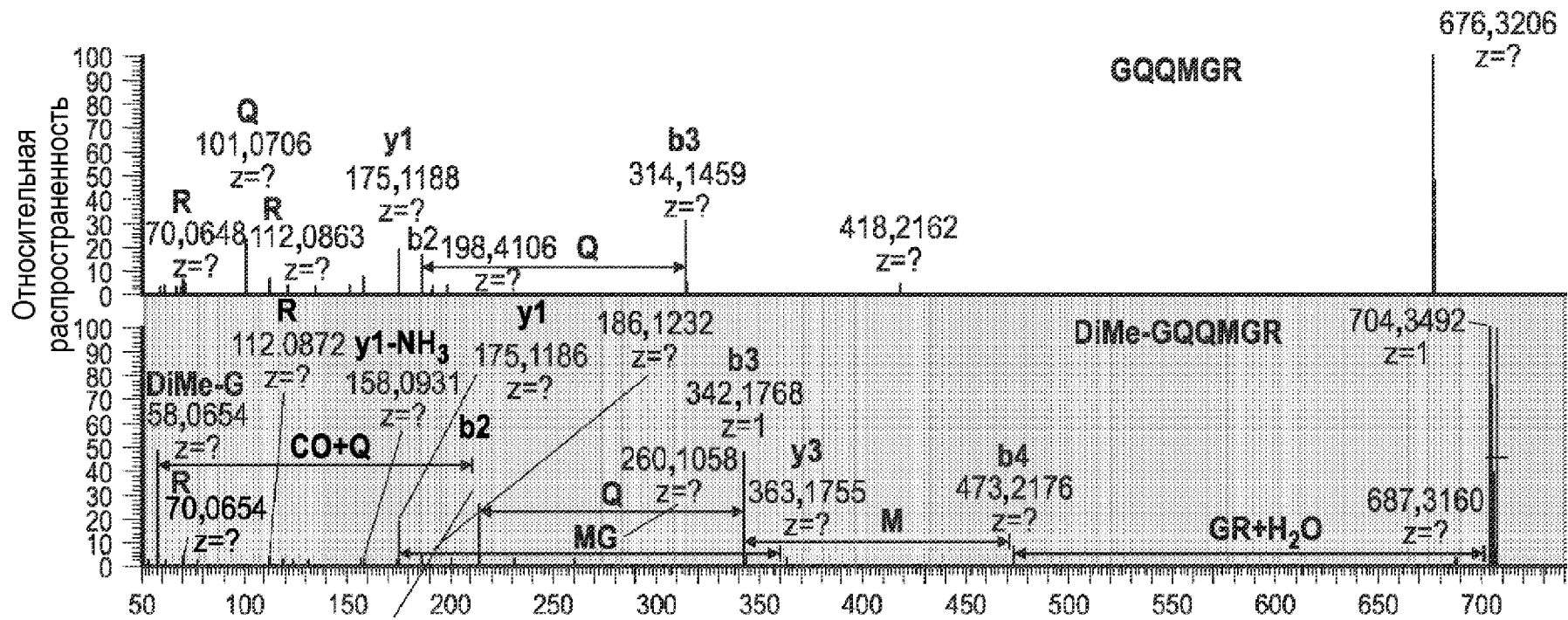
Фиг. 13D



Фиг. 14А



Фиг. 14В



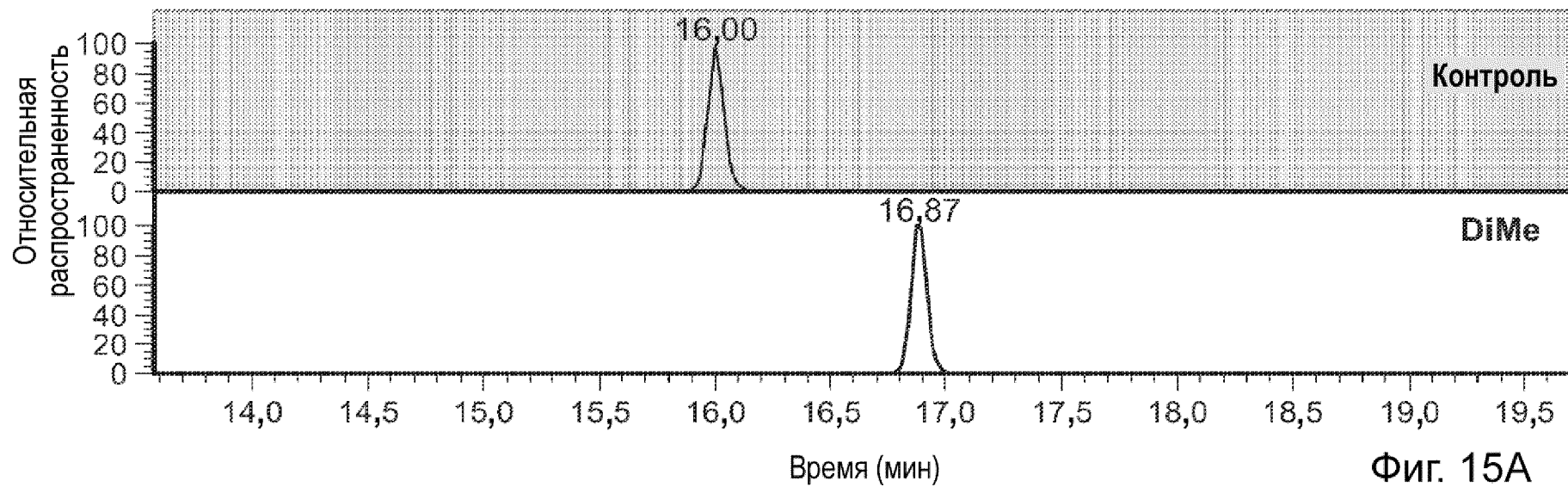
	b		y
---	1	G	6
186,0873	2	Q	5
314,1459	3	Q	4
445,1864	4	M	3
502,2078	5	G	2
---	6	R	1

Диметил			
	b		y
---	1	G	6
214,1186	2	Q	5
342,1772	3	Q	4
473,2177	4	M	3
530,2391	5	G	2
---	6	R	1

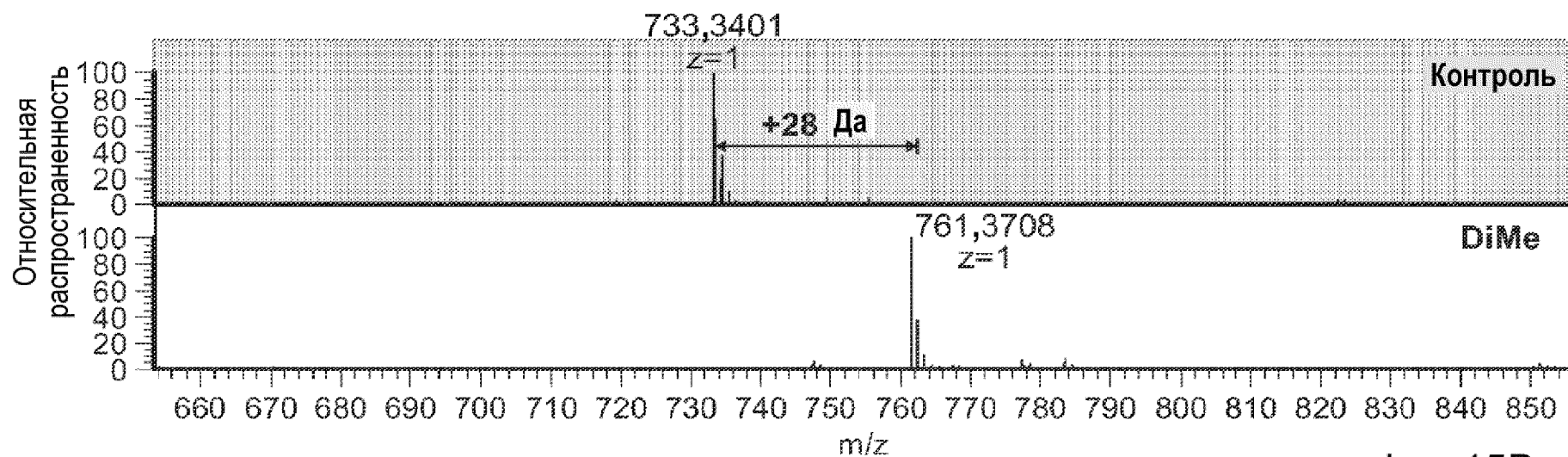
18/32

Фиг. 14С

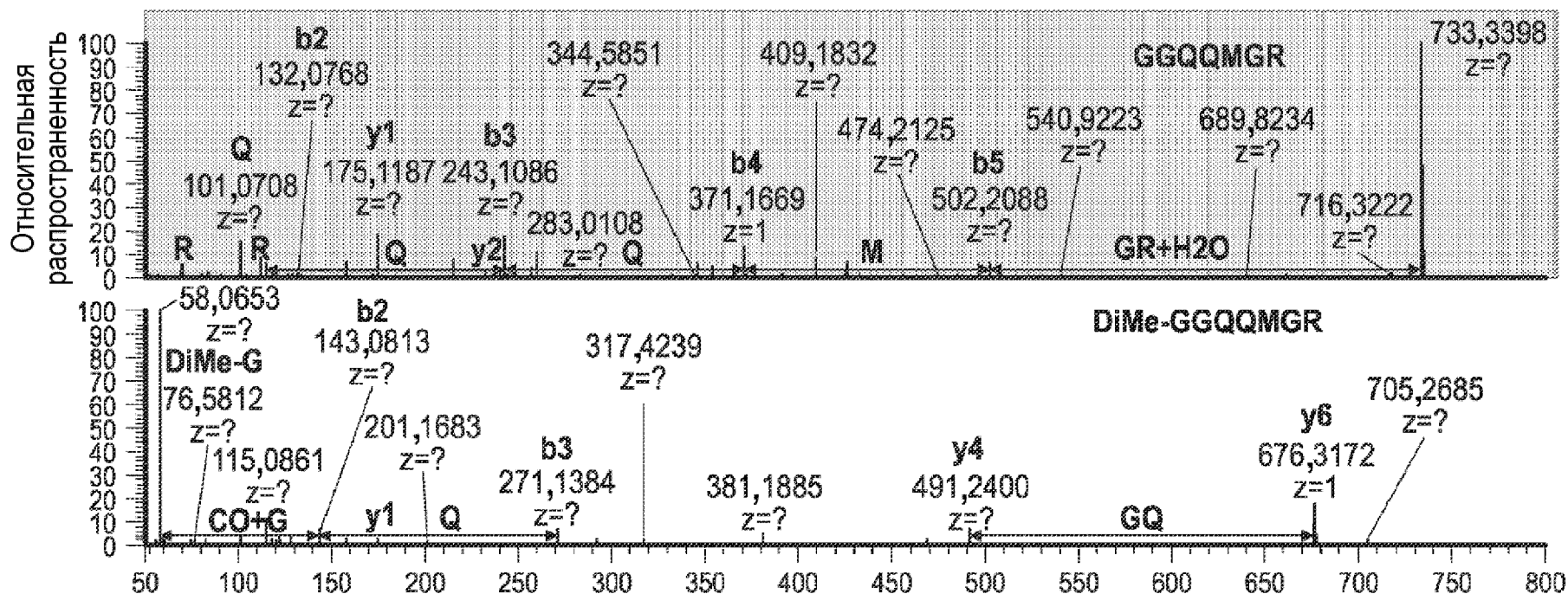




Фиг. 15А



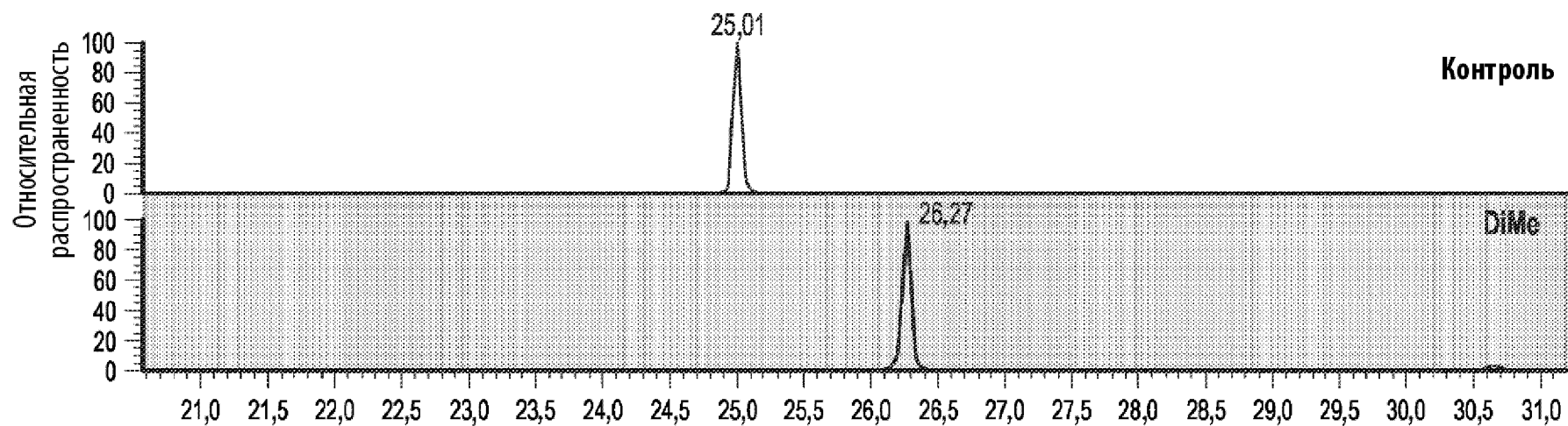
Фиг. 15В



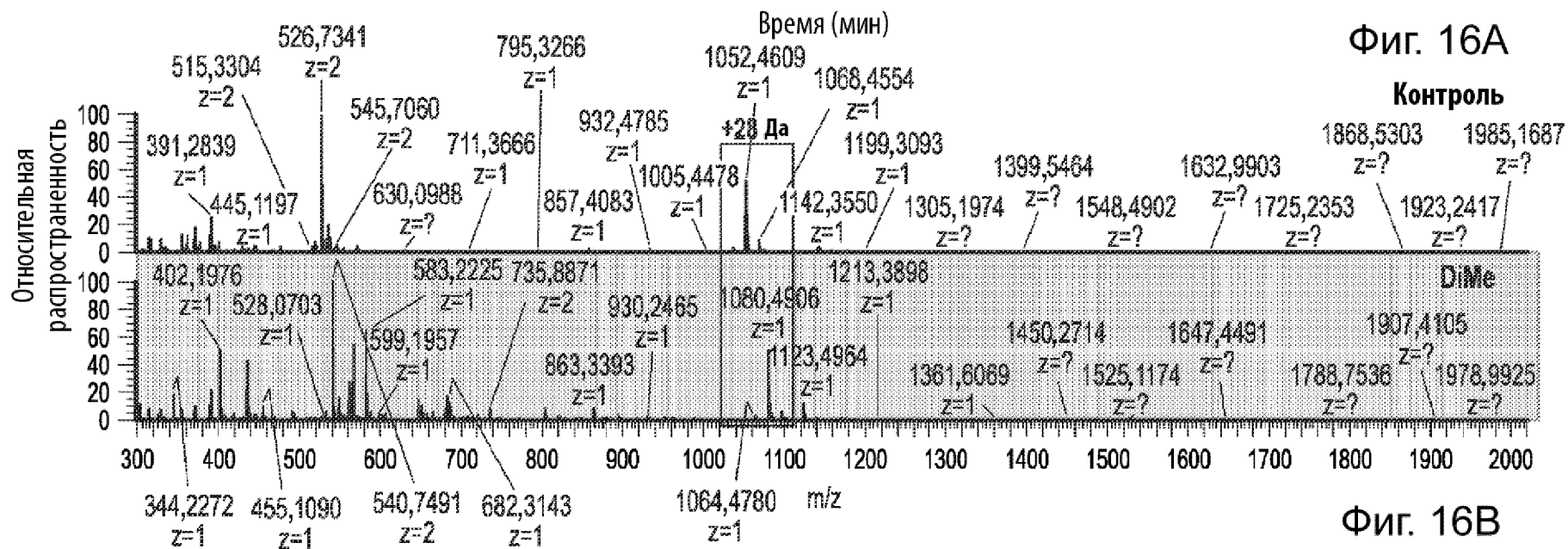
b	y
---	1 G 7 ---
115,0502	2 G 6 676,3195
243,1088	3 Q 5 619,2981
371,1674	4 Q 4 491,2395
502,2078	5 M 3 363,1809
559,2293	6 G 2 232,1404
---	7 R 1 175,1190

b	y
---	1 G 7 ---
143,0815	2 G 6 676,3195
271,1401	3 Q 5 619,2981
399,1987	4 Q 4 491,2395
530,2391	5 M 3 363,1809
587,2606	6 G 2 232,1404
---	7 R 1 175,1190

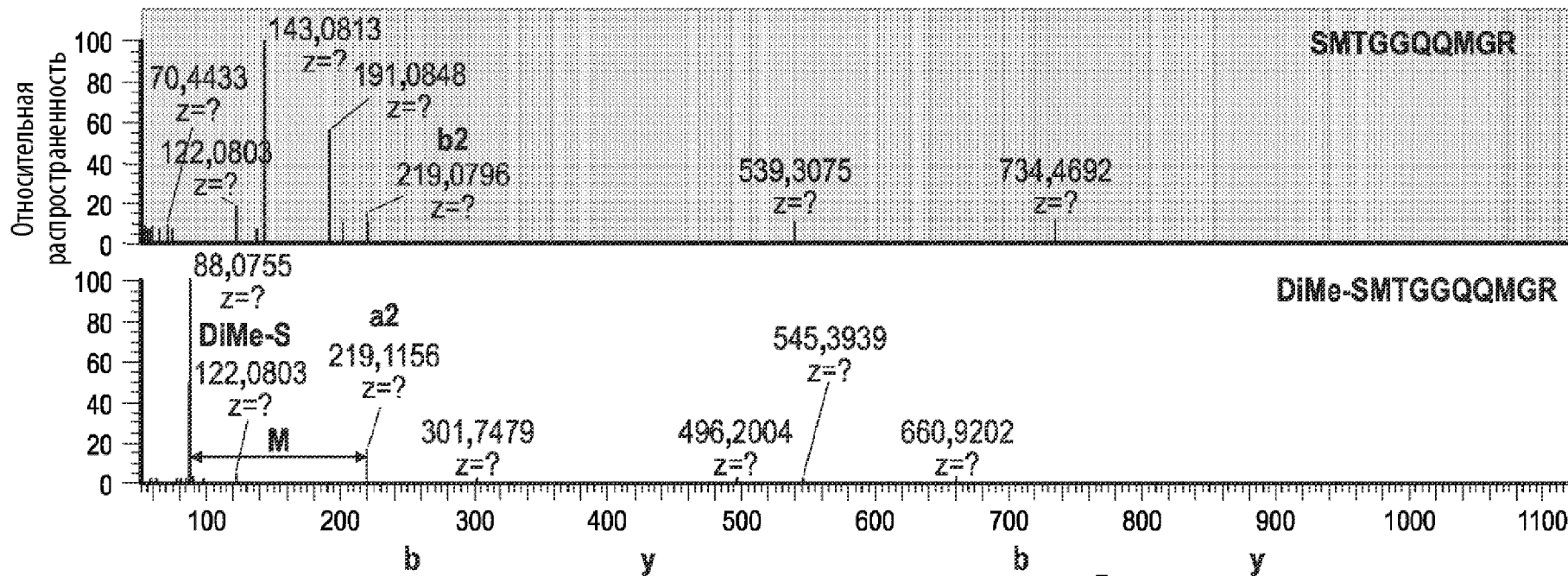
Фиг. 15С



Фиг. 16А



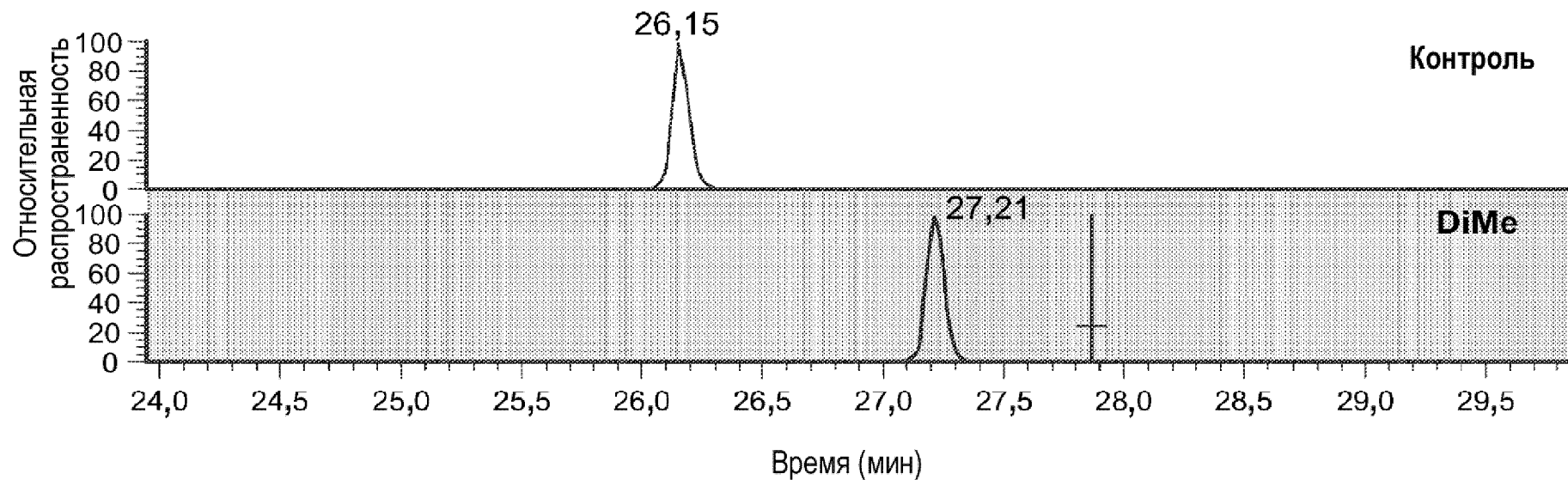
Фиг. 16В



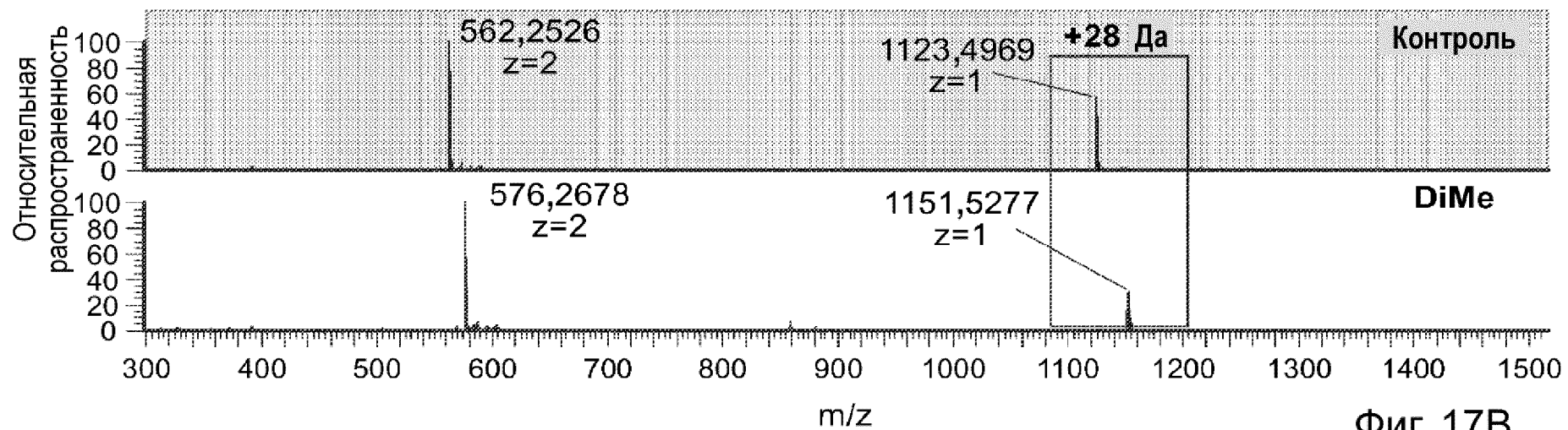
---	1	S	10	---
219,0798	2	M	9	965,4291
320,1275	3	T	8	834,3887
377,1489	4	G	7	733,3410
434,1704	5	G	6	676,3195
562,2290	6	Q	5	619,2981
690,2876	7	Q	4	491,2395
821,3280	8	M	3	363,1809
878,3495	9	G	2	232,1404
---	10	R	1	175,1190

---	1	Диметил	10	---
247,1111	2	M	9	965,4291
348,1588	3	T	8	834,3887
405,1802	4	G	7	733,3410
462,2017	5	G	6	676,3195
590,2603	6	Q	5	619,2981
718,3189	7	Q	4	491,2395
849,3593	8	M	3	363,1809
906,3808	9	G	2	232,1404
---	10	R	1	175,1190

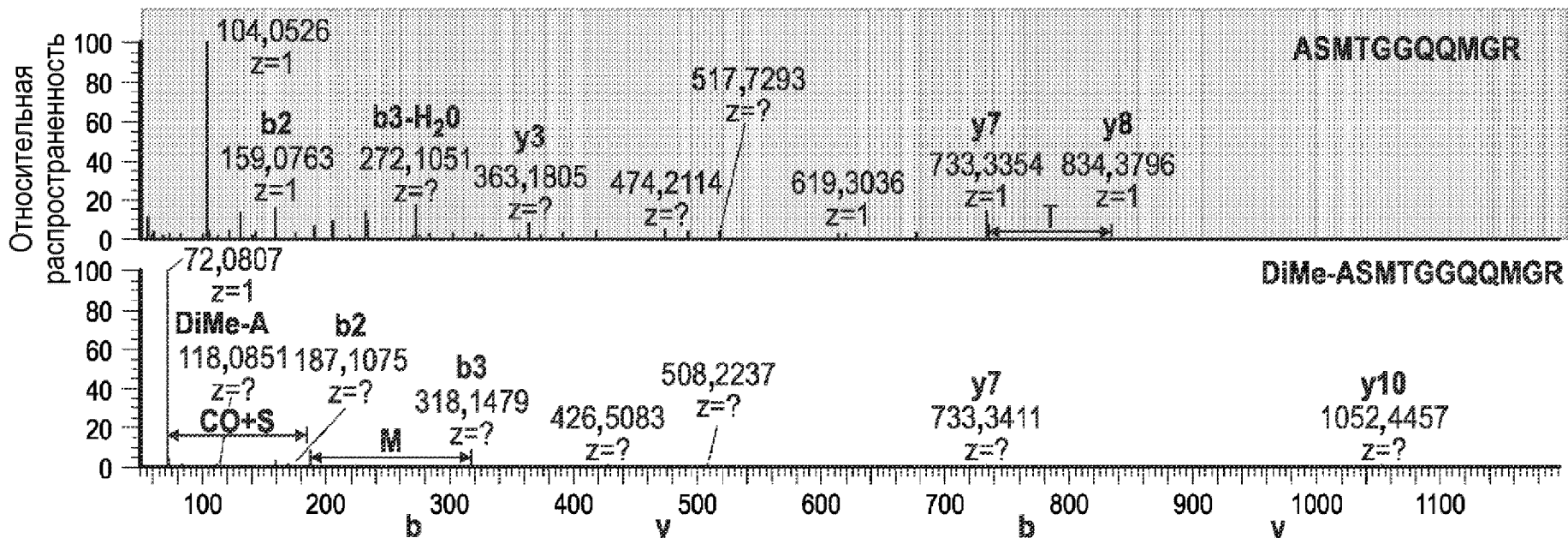
Фиг. 16С



Фиг. 17А

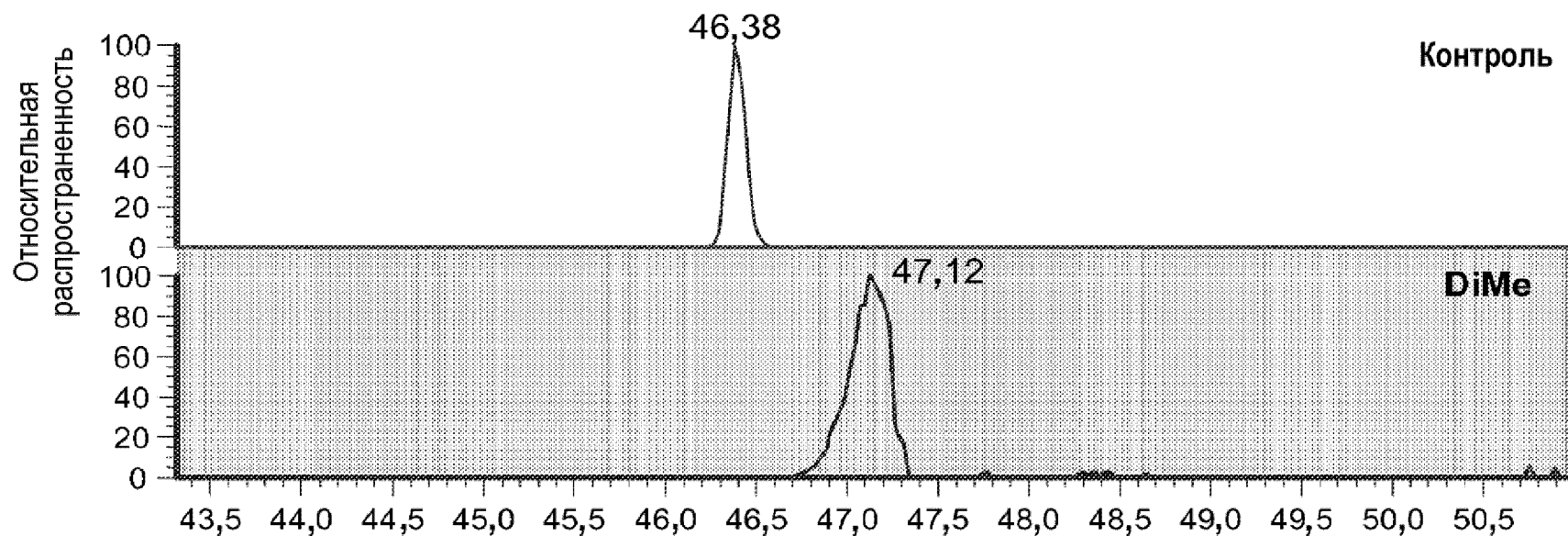


Фиг. 17В

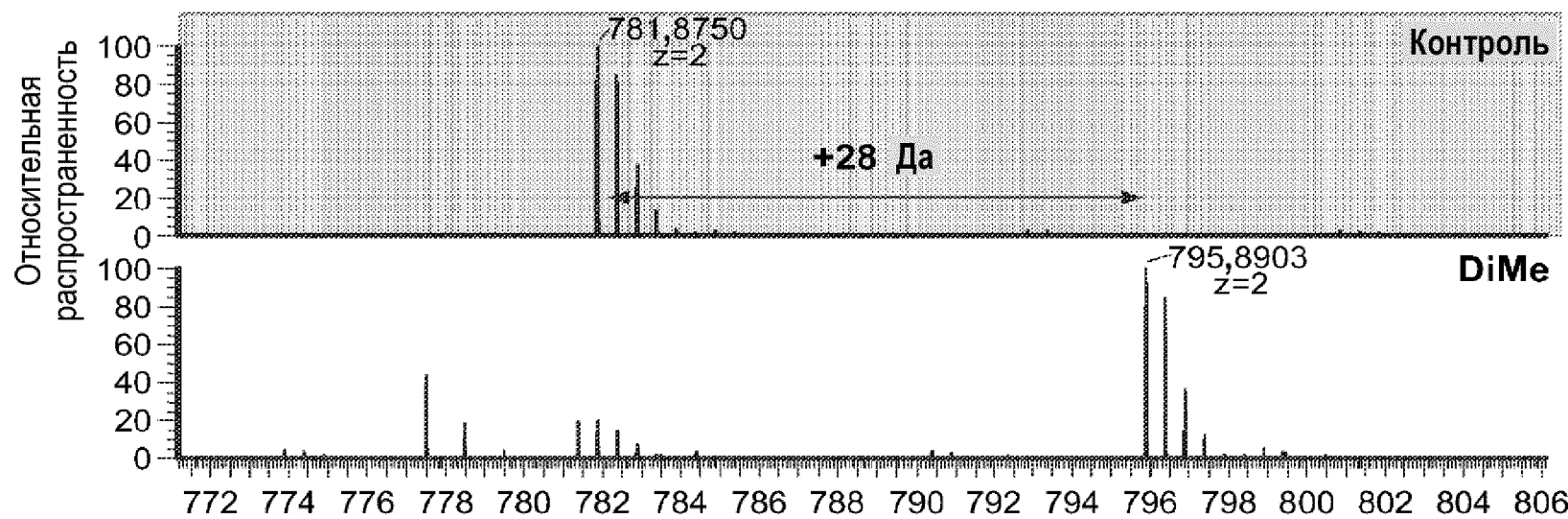


				Диметил			
---	1	A	11	---	1	A	11
159,0764	2	S	10	1052,4612			
290,1169	3	M	9	965,4291	187,1077	2	S
391,1646	4	T	8	834,3887	318,1482	3	M
448,1860	5	G	7	733,3410	419,1959	4	T
505,2075	6	G	6	676,3195	476,2173	5	G
633,2661	7	Q	5	619,2981	533,2388	6	G
761,3247	8	Q	4	491,2395	661,2974	7	Q
892,3651	9	M	3	363,1809	789,3560	8	Q
949,3866	10	G	2	232,1404	920,3964	9	M
---	11	R	1	175,1190	977,4179	10	G
					---	11	R

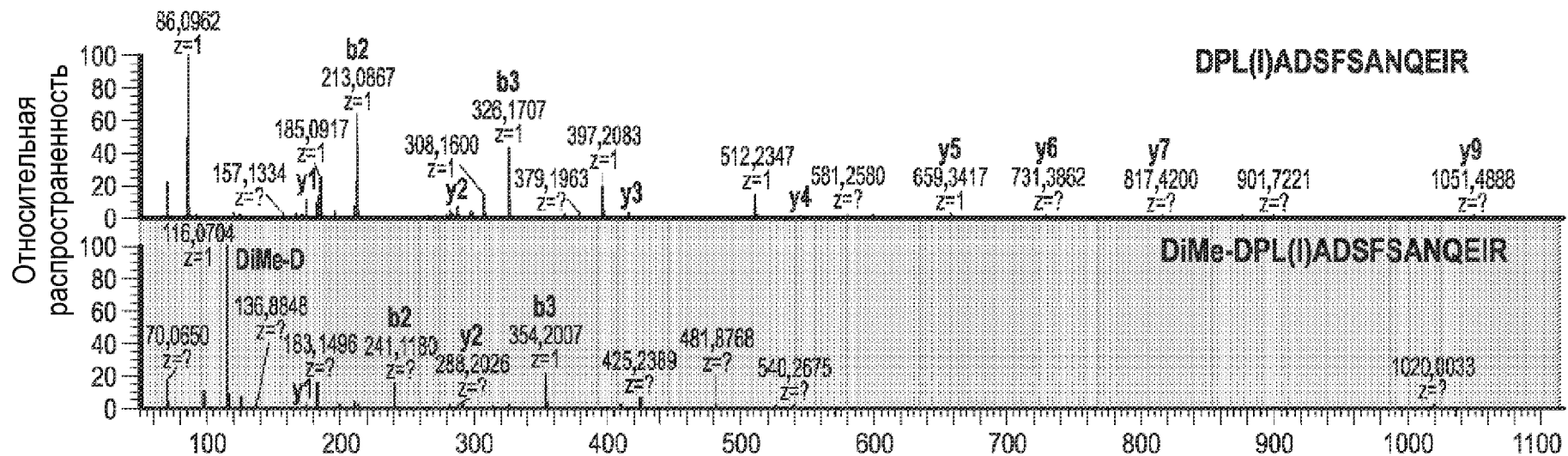
Фиг. 17С



Фиг. 18А



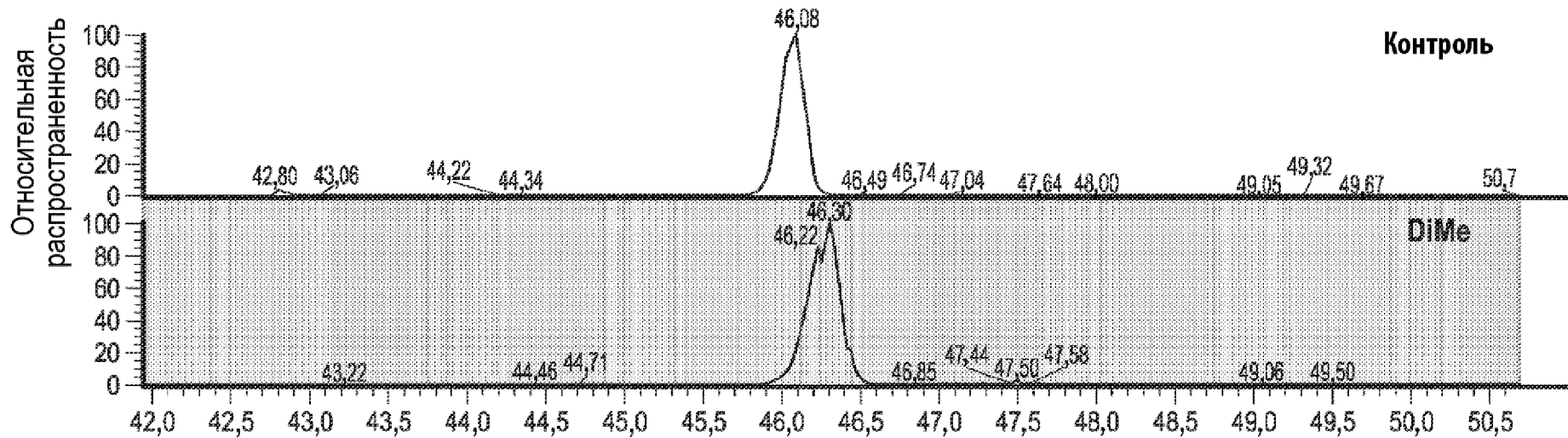
Фиг. 18В



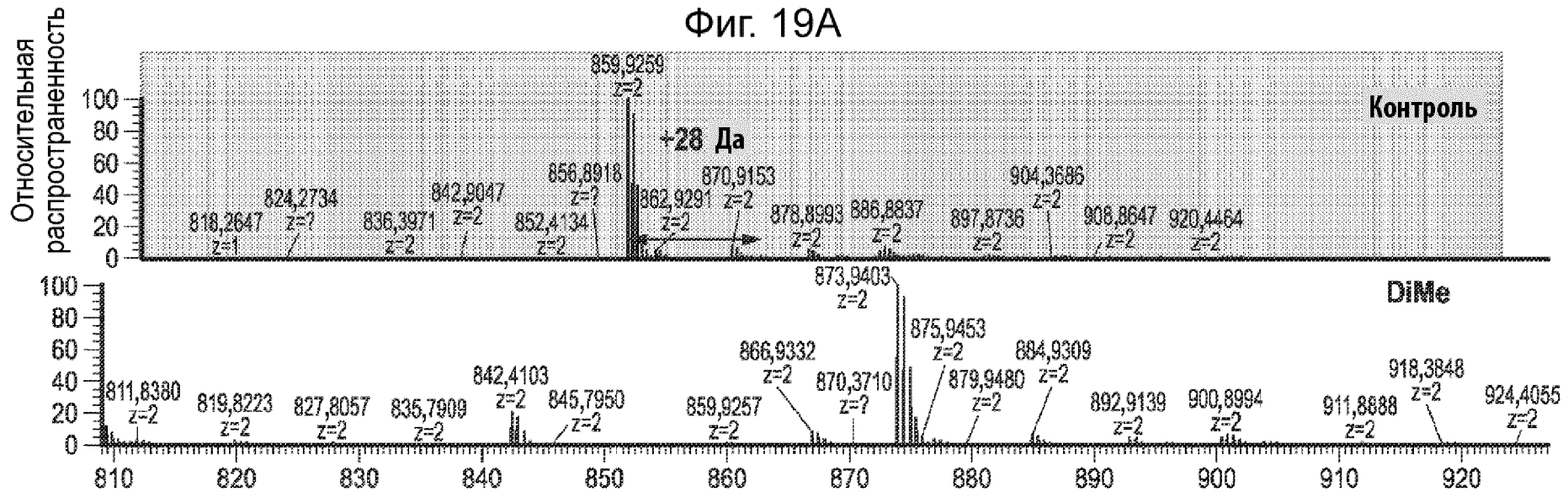
b				y				b				Диметил				y			
—	1	D	15	—	1	D	15	—	1	D	15	—	1	D	15	—	1	D	15
213,0870	2	P	14	1560,8016	—	—	—	241,1183	2	P	14	1560,8016	—	—	—	1017,4888	10	A	6
326,1710	3	L	13	1463,7489	—	—	—	354,2023	3	L	13	1463,7489	—	—	—	1131,5317	11	N	5
439,2551	4	I	12	1350,6648	—	—	—	467,2864	4	I	12	1350,6648	—	—	—	1259,5903	12	Q	4
510,2922	5	A	11	1237,5808	—	—	—	538,3235	5	A	11	1237,5808	—	—	—	1388,6329	13	E	3
625,3192	6	D	10	1166,5436	—	—	—	653,3505	6	D	10	1166,5436	—	—	—	1501,7169	14	I	2
712,3512	7	S	9	1051,5167	—	—	—	740,3825	7	S	9	1051,5167	—	—	—	—	15	R	1
859,4196	8	F	8	964,4847	—	—	—	887,4509	8	F	8	964,4847	—	—	—				
946,4516	9	S	7	817,4163	—	—	—	974,4829	9	S	7	817,4163	—	—	—				
1017,4888	10	A	6	730,3842	—	—	—	1045,5201	10	A	6	730,3842	—	—	—				
1131,5317	11	N	5	659,3471	—	—	—	1159,5630	11	N	5	659,3471	—	—	—				
1259,5903	12	Q	4	545,3042	—	—	—	1287,6216	12	Q	4	545,3042	—	—	—				
1388,6329	13	E	3	417,2456	—	—	—	1416,6642	13	E	3	417,2456	—	—	—				
1501,7169	14	I	2	288,2030	—	—	—	1529,7482	14	I	2	288,2030	—	—	—				
—	15	R	1	175,1190	—	—	—	—	15	R	1	175,1190	—	—	—				

Фиг. 18С

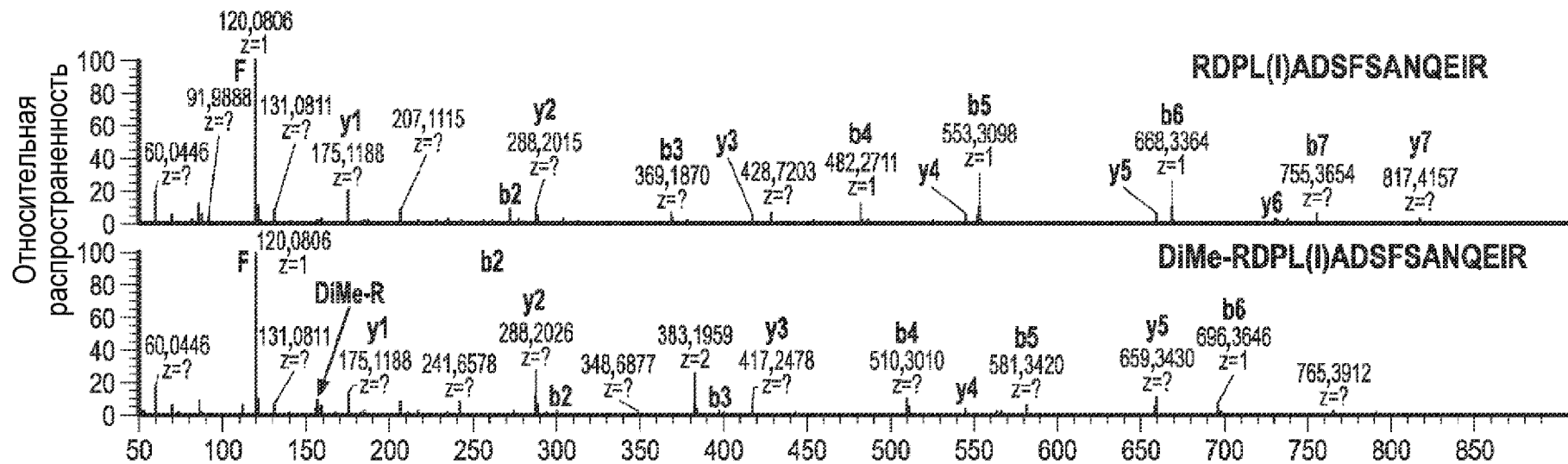




Фиг. 19А



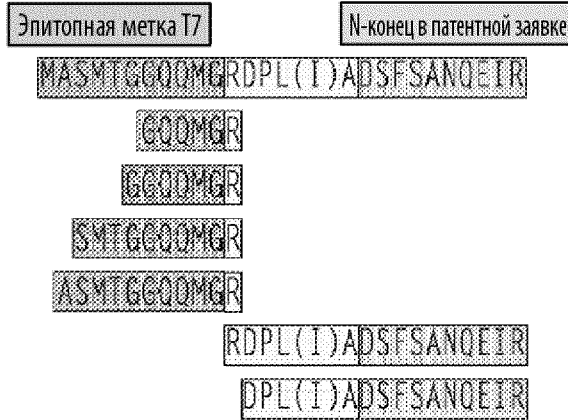
Фиг. 19В



b				y				b				Диметил				y																																																																																																																	
—	1	R	15	—	1	R	15	—	1	R	15	—	1	R	15	—	1	R	15																																																																																																														
272,1353	2	D	14	1562,7445	300,1666	2	D	14	1562,7445	397,2194	3	P	13	1447,7176	510,3035	4	L	12	1350,6648	553,3093	5	A	11	1237,5808	581,3406	5	A	11	1237,5808	668,3362	6	D	10	1166,5436	696,3646	6	D	10	1166,5436	755,3682	7	S	9	1051,5167	783,3995	7	S	9	1051,5167	902,4367	8	F	8	964,4847	930,4680	8	F	8	964,4847	989,4687	9	S	7	817,4163	1017,5000	9	S	7	817,4163	1060,5058	10	A	6	730,3842	1088,5371	10	A	6	730,3842	1174,5487	11	N	5	659,3471	1202,5800	11	N	5	659,3471	1302,6073	12	Q	4	545,3042	1330,6386	12	Q	4	545,3042	1431,6499	13	E	3	417,2456	1459,6812	13	E	3	417,2456	1544,7340	14	I	2	288,2030	1572,7653	14	I	2	288,2030	—	15	R	1	175,1190	—	15	R	1	175,1190

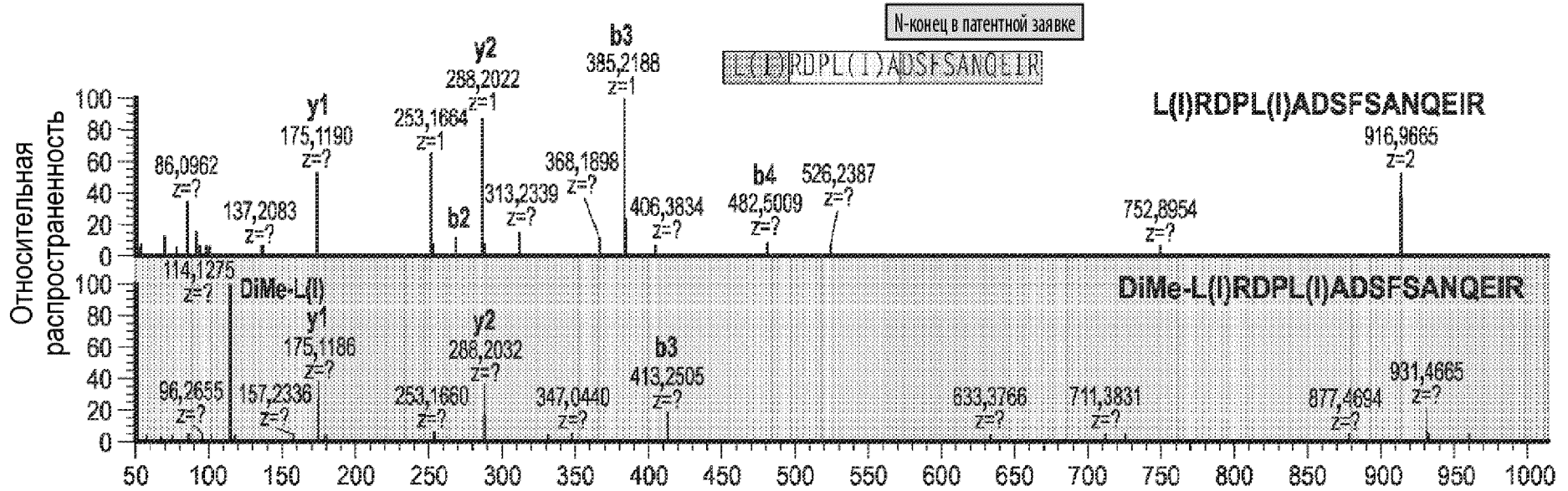
Фиг. 19С

Основная последовательность



Фиг. 20А

Менее распространенная последовательность



Фиг. 20В

Основная последовательность (335 аминокислот, MW 37725,4 Да)

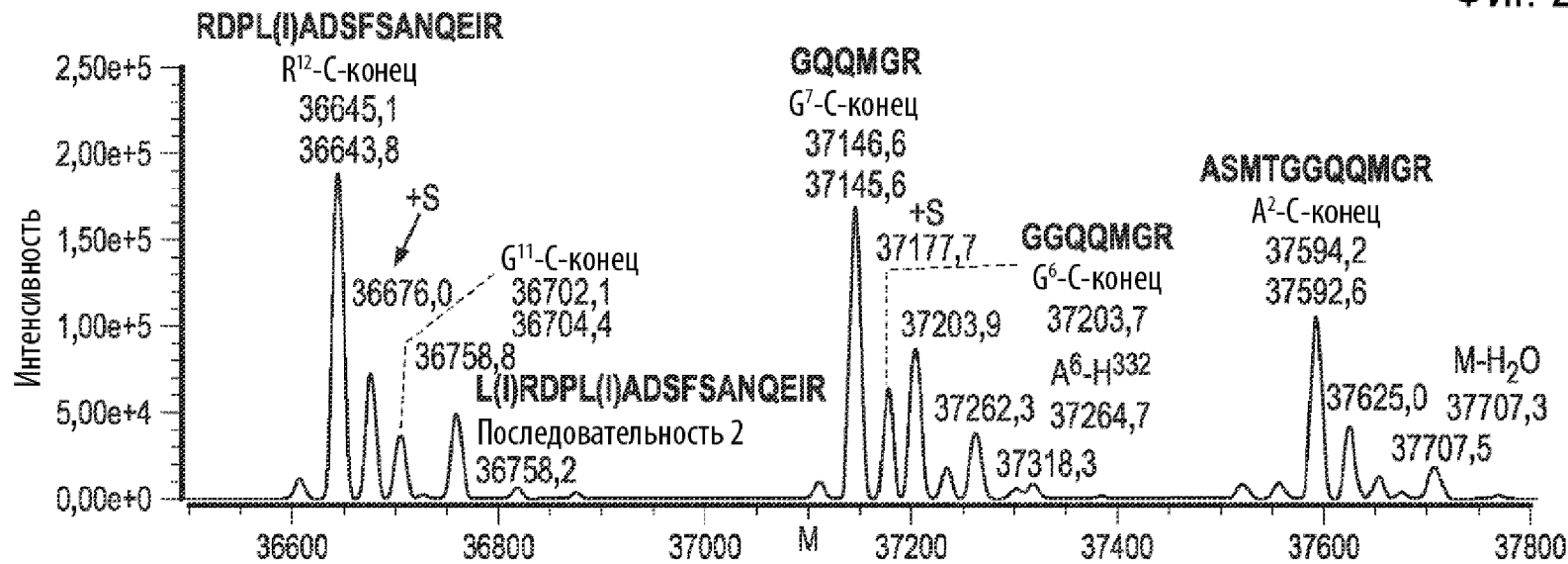
**ASMTGGQ****Q****MGR****RDPL(I)ADSF****SANQEIR****YSEVTPYHVT****SVWTKGVT****PPANFTQGEDVFHAPYVAN**  
**QGWDITKTFN****GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAID**  
**TKNHQLDSKLF****EYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDA**  
**VFTRGDQSKLL****TSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFD****SNGNLKA**  
**IYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTNHHHHHHX**  
**XX**

Менее распространенная последовательность

**L(I)RDPL(I)ADSF****SANQEIR****YSEVTPYHVT****SVWTKGVT****PPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN**  
**GKDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLF**  
**EYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLL**  
**TSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFD****SNGNLKAIYVTDSDSNASI**  
**GMKKYFVGVNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTNHHHHHHXXX**

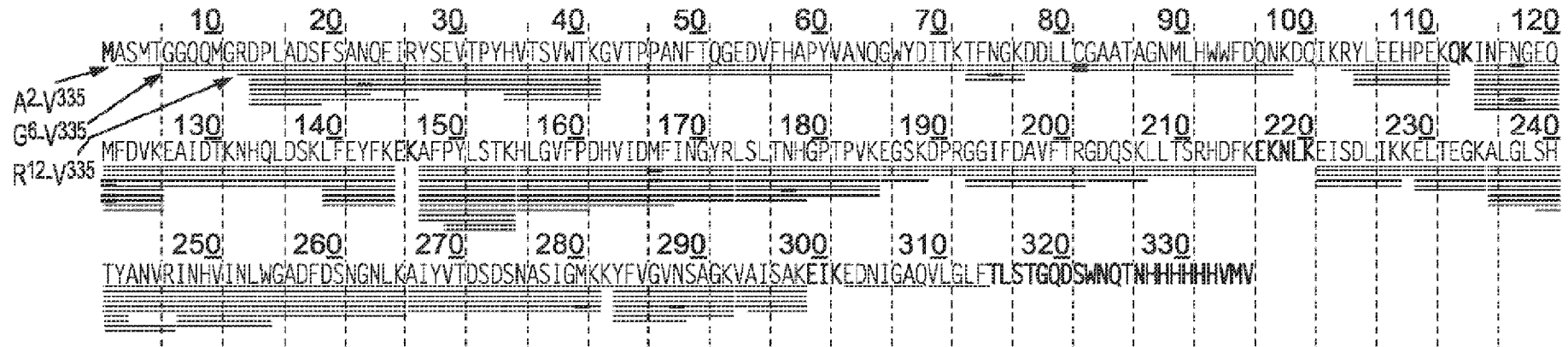
Фиг. 20C

30/32



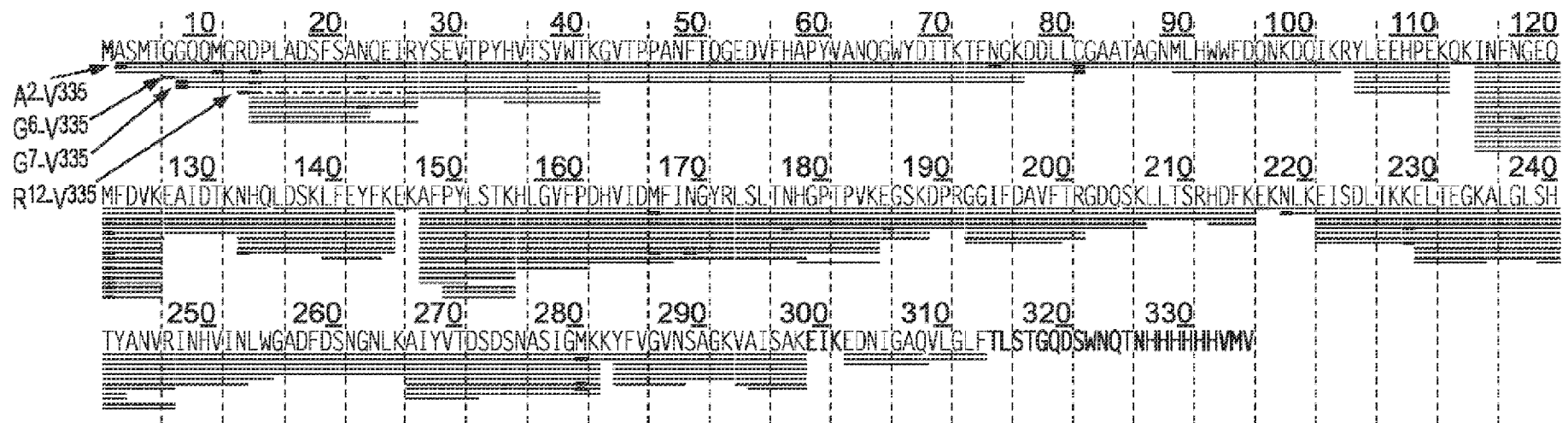
Фиг. 20D

>Fabricator\_N-конец\_С-конец



Фиг. 20E

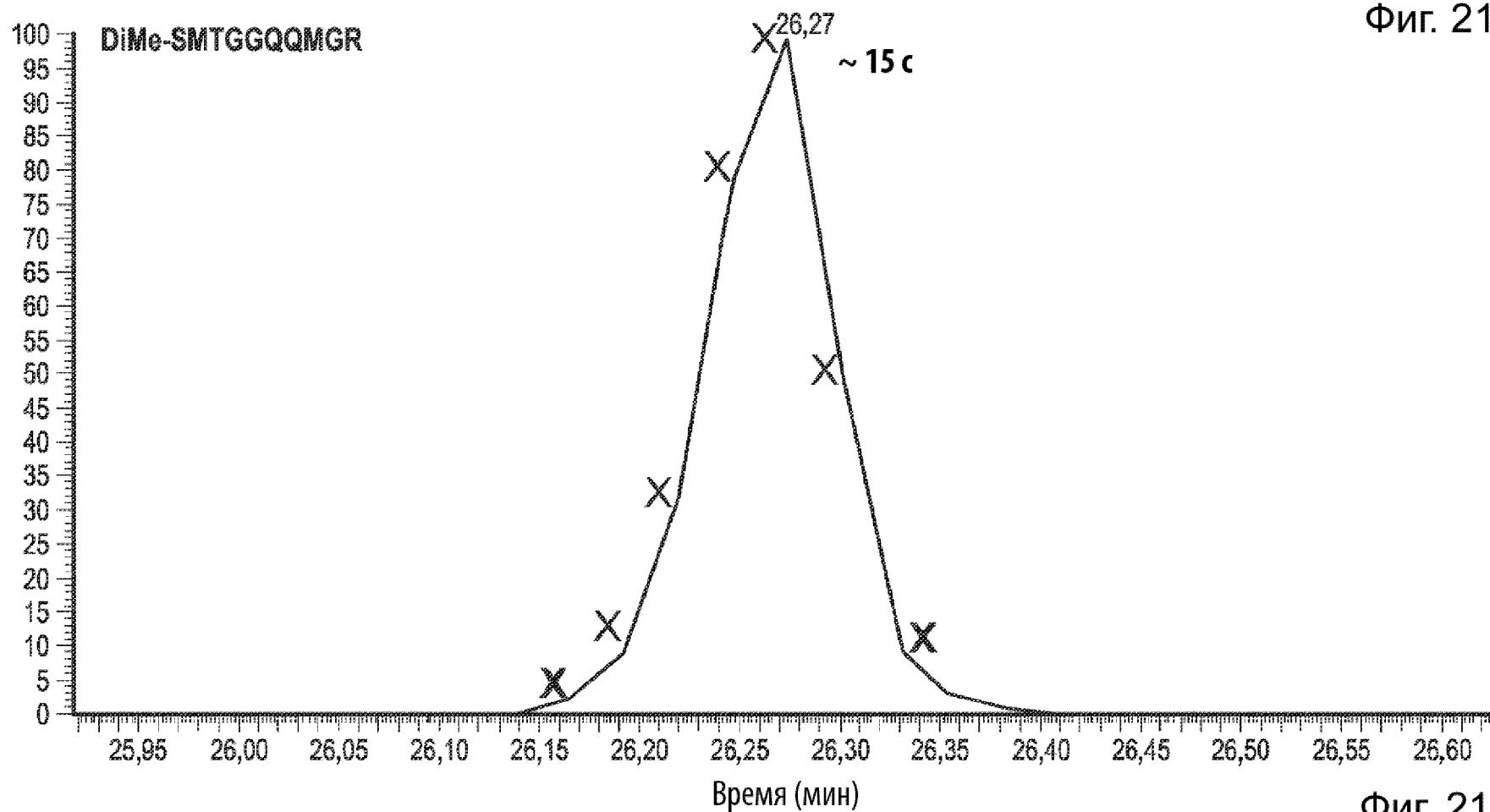
>Fabricator\_N-конец\_С-конец



Фиг. 20F

Ab1	Уксусная кислота	HCHO	NaBH <sub>3</sub> CN	Время реакции	Температура реакции	Остановка реакции	Время остановки реакции	Температура остановки реакции	Эффективность мечения - .SDT
DTT/IAA- DiMe	1%	60 мМ	24 мМ	30 мин	37 °С	NH <sub>2</sub> OH	30 мин	37 °С	99,1%

Фиг. 21А



Фиг. 21В