

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092970** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.04.07

(51) Int. Cl. *H01J 49/00* (2006.01)
H01J 49/26 (2006.01)
G01N 30/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.06.06

**(54) СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ ИЗМЕНЧИВОСТИ
МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОГО СПОСОБА (МАМ) МЕЖДУ ЛАБОРАТОРИЯМИ
И/ЛИ МЕЖДУ ПРИБОРАМИ ПОСРЕДСТВОМ КАЛИБРОВОК ИНТЕНСИВНОСТИ
СИГНАЛОВ В ХОДЕ РАБОТЫ**

(31) 62/763,110; 62/746,323

(32) 2018.06.08; 2018.10.16

(33) US

(86) PCT/US2019/035682

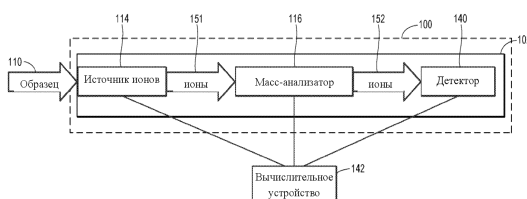
(87) WO 2019/236776 2019.12.12

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Чжан Чжунци (US)

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

(57) Описаны системы и способы для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (МАМ) между лабораториями и/или приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы. В различных аспектах каждый из нескольких приборов с поддержкой МАМ содержит детекторы и характеризуется разными состояниями приборов, определенными разными моделями приборов или наборами настроек. Каждый прибор с поддержкой МАМ получает соответствующие образцы и референтный стандарт в качестве калибранта. Каждый прибор с поддержкой МАМ посредством собственного детектора осуществляет обнаружение изоформ образца в его соответствующем образце и изоформ референтного стандарта в референтном стандарте. Приборы с поддержкой МАМ связаны с процессором (процессорами), которые определяют посредством соответствующих итераций МАМ поправочные коэффициенты и значения количественных показателей в образце, соответствующие изоформам образцов. Поправочные коэффициенты основаны на референтном стандарте, а значения количественных показателей в образце основаны на поправочных коэффициентах. Значение вариации для значений количественных показателей в образце может быть уменьшено с учетом поправочных коэффициентов для каждого из приборов с поддержкой МАМ.



A1

202092970

202092970

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566084ЕА/042

СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ ИЗМЕНЧИВОСТИ МНОГОПАРАМЕТРИЧЕСКОГО СПОСОБА (МАМ) МЕЖДУ ЛАБОРАТОРИЯМИ И/ИЛИ МЕЖДУ ПРИБОРАМИ ПОСРЕДСТВОМ КАЛИБРОВОК ИНТЕНСИВНОСТИ СИГНАЛОВ В ХОДЕ РАБОТЫ

ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки № 62/763110 на патент США (поданной 8 июня 2018 года) и предварительной заявки № 62/746323 на патент США (поданной 16 октября 2018 года). Полное содержание каждой из вышеуказанных предварительных заявок включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к уменьшению изменчивости многопараметрического способа (МАМ) между лабораториями и между приборами посредством калибровок интенсивности сигналов в ходе работы.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Разработка биотерапевтических средств, как правило, включает мониторинг определенных атрибутов терапевтических молекул, в ходе которого такие атрибуты идентифицируют как критические атрибуты качества (CQA) с целью измерения и оценки безопасности и эффективности продукта. В анализах, предназначенных для измерения и оценки атрибутов качества, может использоваться масс-спектрометрия (MS). Обычно под MS понимают аналитическую методику, в основе которой лежит ионизация химических веществ и сортировка ионов на основе их соотношения масса/заряд. Таким образом, с использованием устройства для MS можно измерять массу молекулы в образце. В случае атрибутов полипептида применение масс-спектрометрии позволяет провести оценку большого числа атрибутов качества с использованием лишь нескольких анализов.

[0004] MS можно применять для мониторинга посттрансляционных модификаций (PTM), в том числе профилей гликозилирования, и/или вспомогательных веществ с использованием как данных, полученных посредством детектирования в ультрафиолетовой (UV) области спектра, так и данных о массе за счет реализации способов анализа множества аналитов/атрибутов или так называемых многопараметрических способов (МАМ). В МАМ используется комбинация MS-данных и автоматизированной идентификации и относительного количественного определения атрибутов (Rogers, RS, et al. 2015. Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics. mAbs 7:5, 881-890). Из-за преимуществ МАМ по эффективности и контролю качества его все чаще используют с MS, например, для того, чтобы обеспечивать повышенную избирательность, чувствительность и гибкость для анализа атрибутов качества. МАМ относится к аналитическому подходу, с использованием которого можно количественно определять

множество атрибутов продуктов и процессов (например, атрибутов качества/CQA) в рамках единого анализа. Например, анализы на основе МАМ, как правило, нацелены на отслеживание процессов выделения и очистки целевого продукта, но их все чаще применяют и для анализов в ходе контроля качества при выпуске партий (например, проб).

[0005] Например, процедура МАМ, основанная на протеолитическом расщеплении, после которого следует жидкостно-хроматографический/масс-спектрометрический (LC-MS) анализ протеолитических пептидов (пептиды являются фрагментами более крупных полипептидов, получаемых посредством протеолиза), может быть использована для количественного определения совокупности атрибутов качества терапевтических белков. В данной процедуре используются преимущества разрешающей способности, обеспечиваемой масс-спектрометрическим детектором, при этом MS-интенсивность каждой изоформы (включая модифицированную и немодифицированную формы) протеолитического пептида можно использовать для количественного определения.

[0006] Объединение масс-спектрометрии с МАМ может создавать определенные трудности, поскольку для MS-процедур, как правило, требуются химики-аналитики высокой квалификации и сложная лабораторная инфраструктура. В частности, основной трудностью анализа МАМ на основе масс-спектрометрии является наблюдаемая высокая изменчивость подготовленных проб, используемых в лаборатории, и разных приборов в этих лабораториях. Например, изменчивость в подготовке образцов может возникать из-за разных химиков-аналитиков, которые по-разному осуществляют пробоподготовку, что приводит к различиям между подготовленными образцами. Например, после получения образца химик-аналитик, как правило, выполняет сложную процедуру (например, протеолитическое расщепление), чтобы подготовить этот образец для введения в анализатор. Из-за сложности процедуры пробоподготовки образцы могут в некоторой степени отличаться, даже если исходный образец является единым. Значение различных показателей может изменяться вследствие внесения модификаций, обусловленного длительностью процедуры подготовки образцов. Эти искусственные модификации приводят к неточностям и вариациям в результатах МАМ. Разная эффективность расщепления в ходе проведения подготовки образцов химиком-аналитиком также вносит вклад в изменчивость от лаборатории к лаборатории. Изменчивость также может возникать из-за того, что в лабораторных измерительных приборах используются разные настройки или применяются разные эксплуатационные модели. В настоящее время, чтобы гарантировать воспроизводимость измерений атрибутов, не только все аналитические лаборатории должны использовать сходную модель прибора, но и приборы также должны быть приведены в одинаковые состояния. Однако ограничение лабораторий конкретной моделью может также сдерживать лаборатории от обновления своего оборудования, не позволяя получать выгоду от передовых достижений.

[0007] Недостатки анализа, основанного на MS-МАМ, также возникают из допущений и подходов, используемых в традиционных процедурах МАМ. Например, в

традиционной процедуре MS-MAM значение количественный показатель каждого атрибута (например, разное состояние модификации аминокислотного остатка в пептиде) определяют на основе MS-откликов (например, площадей пика) модифицированного пептида и немодифицированного пептида при следующих допущениях: (1) немодифицированные и модифицированные пептиды характеризуются воспроизводимой степенью извлечения от лаборатории к лаборатории; (2) немодифицированные и модифицированные пептиды характеризуются одинаковым коэффициентом MS-отклика и (3) искусственно вносимые изменения атрибутов являются незначительными.

[0008] Вследствие этих допущений процедура традиционного MAM зависит от нескольких необходимых условий, включающих положения о том, что (1) эффективность расщепления является воспроизводимой от лаборатории к лаборатории; (2) состояния приборов для MS являются абсолютно одинаковыми; и (3) подготовка образцов, выполняемая в разных лабораториях, вносит минимальный или постоянный объем искусственных изменений. Однако в действительности такие требуемые условия трудновыполнимы из-за отличий в процедурах подготовки образцов, навыках химиков-аналитиков, приборах, качестве реагентов и т. д. Степень извлечения пептида также может быть подвержена колебаниям, что приводит к дополнительной изменчивости.

[0009] Дополнительные трудности в достижении требуемых условий включают различия в моделях приборов для MS или настроек прибора. Например, техническое обслуживание одного лабораторного измерительного прибора может отличаться от технического обслуживания другого лабораторного измерительного прибора. Кроме того, коэффициент отклика для пептидов, содержащих разные варианты, в разных лабораториях может отличаться. Дополнительные трудности в достижении требуемых условий включают отличия в процедуре подготовки образцов, навыках химиков-аналитиков, качестве устройств и реагентов, а также в состоянии приборов. Также может различаться величина искусственно вносимой модификации.

[0010] В результате традиционным способом MAM, основанным на MS, не хватает надежности при изменчивости между лабораториями и/или приборами.

[0011] Помимо этого, основным недостатком многопараметрического способа (MAM) на основе масс-спектрометрии является высокая изменчивость получаемых результатов между химиками-аналитиками и приборами. Для воспроизводимых измерений атрибутов требуется не только одинаковая модель прибора для всех аналитических лабораторий, но и сами приборы также должны быть одинаково настроены. Это создает проблемы в долгосрочной перспективе, принимая во внимание быстрое развитие новых хроматографических и масс-спектрометрических технологий. В дополнение различие в эффективности расщепления и искусственных модификациях (например, в окислении, дезамидировании, изомеризации остатков аспарагиновой кислоты и фрагментации) во время подготовки образцов также вносит вклад в изменчивость от лаборатории к лаборатории. Эти недостатки необходимо устранить, чтобы обеспечить долгосрочный успех MAM, например в условиях текущих правил GMP.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0012] Следовательно, существует потребность в системах и способах для уменьшения изменчивости многопараметрического способа (МAM) на основе MS между лабораториями и/или приборами посредством калибровок интенсивности сигналов в ходе работы.

[0013] Описываемые в данном документе система и способы раскрываются с целью уменьшения изменчивости многопараметрического способа (МAM) между лабораториями и/или приборами в ходе работы. В различных вариантах осуществления описано, что данные системы и способы могут быть использованы для определения количественного показателя атрибута в образце (например, значений количественного показателя каждого атрибута качества в образце) с использованием измеренного или известного количественного показателя атрибута в референтном стандарте (например, референтных стандартных значений количественного показателя каждого атрибута качества) в качестве калибранта. Данная новая методика повышает межлабораторную прецизионность и/или межинструментальную точность и обеспечивает уменьшение изменчивости среди лабораторий и/или приборов. Например, данная новая методика вообще не требует или требует минимальной дополнительной работы химика-аналитика или лаборатории, поскольку данные по референтному стандарту для МAM уже, как правило, получены. Это объясняется тем, что для типичной процедуры МAM референтный стандарт анализируют параллельно с образцами для других целей, например, с целью проверки пригодности системы или подлинности. Кроме того, использование референтного стандарта в качестве калибранта также является выгодным, поскольку в референтном стандарте большинство количественных показателей атрибутов остаются постоянными в ходе всего срока использования стандарта, и по этой причине референтный стандарт может быть использован как калибрانت особым образом, чтобы корректировать разницу между приборами или процедурами подготовки образцов.

[0014] В различных вариантах осуществления, описанных в данном документе, описаны системы и способы для уменьшения изменчивости анализов МAM между лабораториями или приборами посредством калибровок интенсивности сигналов в ходе работы. Например, в некоторых вариантах осуществления такие системы и способы могут предусматривать первый прибор с поддержкой МAM, содержащий первый детектор. Первый прибор с поддержкой МAM может характеризоваться состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек. Первый прибор с поддержкой МAM может быть приспособлен для приема первого образца и референтного стандарта. Первый прибор с поддержкой МAM может быть дополнительно приспособлен для обнаружения посредством первого детектора изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте.

[0015] Системы и способы могут дополнительно предусматривать один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МAM. Один или

несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, могут быть приспособлены для определения посредством первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца. Первый набор поправочных коэффициентов может быть основан на референтном стандарте. Один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, могут быть дополнительно приспособлены для определения первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов.

[0016] Системы и способы могут дополнительно предусматривать второй прибор с поддержкой МАМ, содержащий второй детектор. Второй прибор с поддержкой МАМ может характеризоваться состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из: (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек.

[0017] В различных вариантах осуществления состояние второго прибора может отличаться от состояния первого прибора.

[0018] Второй прибор с поддержкой МАМ может быть приспособлен для приема второго образца и референтного стандарта. Второй прибор с поддержкой МАМ может быть дополнительно приспособлен для обнаружения посредством второго детектора изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте.

[0019] Системы и способы могут дополнительно предусматривать один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ. Один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, могут быть приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца. Второй набор поправочных коэффициентов может быть основан на референтном стандарте. Один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, могут быть дополнительно приспособлены для определения второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов.

[0020] Учитывая поправочные коэффициенты, определенные для каждого прибора, изменчивость измерений между первым прибором с поддержкой МАМ и вторым прибором с поддержкой МАМ может быть уменьшена. Например, значение вариации для первого набора значений количественных показателей для образца и второго набора значений количественных показателей для образца может быть уменьшено с учетом первого набора поправочных коэффициентов для первого прибора с поддержкой МАМ и второго набора поправочных коэффициентов для второго прибора с поддержкой МАМ.

[0021] В дополнительных вариантах осуществления раскрыты системы и способы калибровки для уменьшения изменчивости прибора с поддержкой МАМ для нескольких

периодов времени посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы. В таких вариантах осуществления прибор с поддержкой МАМ в течение первого периода времени может принимать первый образец и референтный стандарт.

[0022] Прибор с поддержкой МАМ посредством детектора в течение первого периода времени может обнаруживать изоформу первого образца в первом образце и первую изоформу референтного стандарта в референтном стандарте.

[0023] Один или несколько процессоров могут быть приспособлены к определению посредством первой итерации МАМ в течение первого периода времени первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте.

[0024] Один или несколько процессоров также могут быть приспособлены для определения посредством первой итерации МАМ и в течение первого периода времени первого набора значений показателей для образца, соответствующего изоформе первого образца. Первый набор значений количественных показателей образца может быть основан на первом наборе поправочных коэффициентов. Прибор с поддержкой МАМ в течение первого периода времени может характеризоваться состоянием первого прибора, заданным первым набором настроек.

[0025] Прибор с поддержкой МАМ в течение второго периода времени может быть приспособлен для приема второго образца и референтного стандарта.

[0026] Прибор с поддержкой МАМ может обнаруживать посредством детектора в течение первого периода времени изоформу первого образца в первом образце и первую изоформу референтного стандарта в референтном стандарте.

[0027] Один или несколько процессоров могут быть выполнены с возможностью посредством второй итерации МАМ в течение второго периода времени определять второй набор поправочных коэффициентов, соответствующий изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте.

[0028] Один или несколько процессоров также могут быть приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ и в течение второго периода времени второго набора значений количественных показателей для образца, соответствующего изоформе второго образца. Второй набор значений количественных показателей в образце может быть основан на втором наборе поправочных коэффициентов. Прибор с поддержкой МАМ в течение второго периода времени может характеризоваться состоянием второго прибора, определенным вторым набором настроек.

[0029] Состояние второго прибора с поддержкой МАМ в течение первого периода времени может отличаться от состояния второго прибора с поддержкой МАМ в течение второго периода времени.

[0030] Учитывая поправочные коэффициенты, определенные для каждого периода времени, изменчивость измерений между итерациями МАМ прибора с поддержкой МАМ между первым периодом времени и вторым периодом времени можно уменьшить. Например, значение вариации для первого набора значений количественных показателей

для образца и второго набора значений количественных показателей для образца может быть уменьшено с учетом первого набора поправочных коэффициентов для первого прибора с поддержкой МАМ и второго набора поправочных коэффициентов для второго прибора с поддержкой МАМ.

[0031] Как описано в данном документе далее, например ссылаясь на фигуры 4а, 4b, 5а и 5b, анализ различных изоформ демонстрирует, что применение систем и способов, раскрытых в данном документе, уменьшает изменчивость между лабораториями и/или приборами (например, RSD внутрилабораторной прецизионности) в два или три раза по сравнению с существующими процедурами с поддержкой МАМ. Благодаря раскрытым системам и способам больше не требуется согласованность между лабораториями по моделям приборов, по приборам или по итерациям МАМ, выполняемыми в разные периоды времени. В то же время незначительные изменения в процедуре расщепления от лаборатории к лаборатории, а также изменения, обусловленные автоматизацией, существенно не влияют на результаты анализов, полученные в разных лабораториях, с разными приборами или итерациями МАМ, выполняемыми в разные периоды времени.

[0032] Новая система и способы также предоставляют дополнительные возможности для других инструментальных средств, таких как трехквadrupольный прибор для мониторинга выбранной реакции, поскольку благодаря раскрытым системам и способам более не требуется согласованность по коэффициентам отклика между разными пептидными изоформами.

[0033] Кроме того, раскрытые системы и способы обладают значительными преимуществами над традиционными способами, поскольку новые системы и способы существенно уменьшают вариацию результатов между лабораториями посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы. Новая система и способы, описанные в данном документе, по сути устраняют требование к МАМ по использованию единых оборудования/приборов, что является основной проблемой в существующих рабочих циклах МАМ. Более того, новые системы и способы применимы к любым приложениям с поддержкой МАМ, когда требуется точное количественное определение атрибутов качества. Кроме того, поскольку референтные стандарты, как правило, анализируют параллельно с образцами в биофармацевтических рабочих циклах, от химика-аналитика не требуется выполнение какой-либо дополнительной работы.

[0034] Согласно указанному выше и содержимому данного документа настоящее изобретение включает усовершенствования компьютерных функциональных возможностей или усовершенствования других технологий по меньшей мере по той причине, что в формуле изобретения излагается, что, к примеру, прибор(ы) с поддержкой МАМ могут быть усовершенствованы путем уменьшения изменчивости среди приборов с поддержкой МАМ, осуществляющих процедуры МАМ с одним и тем же образцом (например, с одним и тем же образцом протеолитических (протеолитического) пептида (пептидов) и с использованием референтного стандарта в качестве калибранта. То есть в

настоящем изобретении описаны варианты усовершенствования функционирования собственно компьютера, или любой другой технологии, или технической области, поскольку системы и способы уменьшают изменчивость среди приборов с поддержкой МАМ. Описанное выше усовершенствует известный уровень техники по меньшей мере потому, что традиционные способы МАМ требуют условий, трудновыполнимых из-за отличий в процедуре подготовки образцов, навыках химиков-аналитиков, качестве приборов и реагентов.

[0035] Настоящее изобретение относится к усовершенствованию других технологий или технических областей по меньшей мере потому, что приборы с поддержкой МАМ могут быть откалиброваны даже в том случае, если они относятся к разным моделям приборов и имеют разные наборы настроек, даже среди разных лабораторий.

[0036] Настоящее изобретение включает применение уникальных усовершенствований для конкретного устройства или в условиях использования конкретного устройства, например приборов с поддержкой МАМ.

[0037] В настоящее изобретение включены специфические признаки, отличающиеся от тех, которые характеризуют хорошо понятную, обычную, традиционную деятельность в области разработки или исследования биотерапевтических средств, и/или добавлены нестандартные стадии, которые фокусируют акцент настоящего изобретения на конкретных применимых приложениях, например, уменьшение изменчивости многопараметрического способа (МАМ) между лабораториями и приборами посредством калибровок интенсивности сигналов в ходе работы.

[0038] В дополнение для преодоления описанных в данном документе недостатков описаны новые системы и способы калибровки для вычисления количественного показателя атрибута в образце с использованного измеренного атрибута в референтном стандарте в качестве калибранта. В референтном стандарте большинство атрибутов качества остаются постоянными в течение всего срока использования стандарта и поэтому могут служить калибрантом для корректировки отличий между приборами или процедурами подготовки образцов. Поскольку данные по референтному стандарту обычно получают посредством типичного способа МАМ, какой-либо дополнительной работы химика-аналитика не требуется. Данные испытаний с большим количеством атрибутов продемонстрировали, что данная методология значительно уменьшает изменчивость между приборами. Благодаря этой методологии более не требуется согласовывать модель прибора и процедуру подготовки образцов. В результате изменения в процедуре расщепления усовершенствования современной инструментальной техники не будут оказывать значимого влияния на результат анализа. Новые системы и способы также обеспечивают возможность калибровки других инструментальных средств, таких как трехквადрупольный прибор для мониторинга выбранной реакции, поскольку больше не требуются согласующиеся коэффициенты отклика между разными пептидными изоформами.

[0039] Как описано в данном документе, многопараметрические способы, основанные на протеолитическом расщеплении, с последующим LC-MS-анализом протеолитических пептидов разработаны для количественного определения совокупности атрибутов качества терапевтических белков. В данных способах используются преимущества разрешающей способности, обеспечиваемой масс-спектрометрическим (MS) детектором, при этом MS-интенсивность каждой изоформы (включая модифицированную и немодифицированную формы) протеолитического пептида используется для количественного определения. Благодаря высокой специфичности данных способов применительно к каждому клинически значимому атрибуту качества, такие способы привлекли значительное внимание в биофармацевтической отрасли.

[0040] Преимущества станут более понятными специалистам в данной области техники из следующего описания предпочтительных вариантов осуществления, которые были показаны и описаны посредством иллюстрации. Будет понятно, что представленные варианты осуществления могут допускать возможность других и отличающихся вариантов осуществления, а их подробности допускают возможность модификации в различных аспектах. Соответственно, графические материалы и описание необходимо рассматривать как иллюстративные по сути, а не как ограничительные.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0041] На фигурах, описанных ниже, представлены различные аспекты системы и способов, раскрытых в данном документе. Следует понимать, что на каждой фигуре представлен вариант осуществления конкретного аспекта раскрытых системы и способов и что каждая из фигур предназначена для согласования с его возможными вариантами осуществления. Кроме того, там, где это возможно, следующее описание относится к числовым обозначениям ссылок, имеющимся на следующих фигурах, на которых признаки, представленные на нескольких фигурах, обозначены согласующимися числовыми обозначениями ссылок.

[0042] На графических материалах показаны устройства, которые обсуждаются в данном документе, однако следует понимать, что варианты осуществления по настоящему изобретению не ограничены точными устройствами и инструментальными средствами, которые показаны, при этом:

[0043] на фигуре 1 показан иллюстративный прибор с поддержкой МАМ, содержащий масс-спектрометр, согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0044] На фигуре 2 показана иллюстративная технологическая схема уменьшения изменчивости между первым прибором с поддержкой МАМ и вторым прибором с поддержкой МАМ посредством калибровок интенсивности сигналов в ходе работы согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0045] На фигуре 3 представлена иллюстрация способа уменьшения изменчивости прибора с поддержкой МАМ для нескольких периодов времени посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы согласно различным вариантам осуществления,

раскрытым в данном документе.

[0046] На фигуре 4a представлена диаграмма, изображающая уменьшение вариации значений количественных показателей между приборами/между лабораториями для заданной изоформы в шести иллюстративных итерациях МАМ согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0047] На фигуре 4b представлена диаграмма, изображающая уменьшение отклонений между приборами/между лабораториями по шести иллюстративным изоформам, включая изоформу, представленную на фигуре 4a, согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0048] На фигуре 5a представлена диаграмма, изображающая уменьшение вариации значений количественных показателей между приборами/между лабораториями в двенадцати иллюстративных итерациях МАМ согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0049] На фигуре 5b представлена диаграмма, изображающая уменьшение отклонений между приборами/между лабораториями по 57 атрибутам качества согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0050] На фигуре 6 представлена диаграмма измеренных количественных показателей двух атрибутов в образце при двух разных установках приборов и двух разных процедурах подготовки образцов согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0051] На фигуре 7 представлена диаграмма, изображающая иллюстративное сравнение внутрилабораторной прецизионности с калибровкой коэффициента отклика и без нее согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0052] На фигуре 8 представлена диаграмма варианта осуществления калибровки искусственной модификации для атрибутов 2 типа, демонстрирующая аналогичные результаты как и для а-калибровки коэффициента отклика согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0053] На фигуре 9 представлена диаграмма результатов b-калибровки искусственной модификации для атрибутов 3 типа по сравнению с а-калибровкой коэффициента отклика согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0054] На фигуре 10 представлена диаграмма варианта осуществления, изображающая результаты калибровки по двум стандартам (а и b) для атрибутов 3 типа по сравнению с калибровкой коэффициента отклика по одному стандарту (а) согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0055] На фигуре 11 представлена диаграмма, показывающая усовершенствование, внесенное в согласованность двух наборов данных, полученных в двух разных системах LC-MS, посредством калибровки коэффициента отклика согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0056] На фигуре 12 представлена диаграмма, показывающая измеренное значение

содержания гликоформы в четырех последовательностях, в трех экземплярах каждой последовательности, согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0057] На фигуре 13 представлена диаграмма, показывающая взаимосвязь количественного показателя атрибута и RSD в пределах последовательности по трем атрибутам согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[0058] Предпочтительные варианты осуществления на фигурах представлены только с иллюстративной целью. Альтернативные варианты осуществления систем и способов, представленных в данном документе, могут быть применены без отклонения от принципов настоящего изобретения, описанного в данном документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0059] На фигуре 1 показан иллюстративный прибор 100 с поддержкой МАМ, содержащий масс-спектрометр (MS) 102, согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе. В данном документе описано, что МАМ может быть использован для одновременного анализа множества свойств или атрибутов (например, атрибутов качества) молекулы (например, белка или изоформы). Для измерения свойств или атрибутов отдельных молекул масс-спектрометр 102 может принимать образец 110 молекул или пептидов, такой как образец изоформ или референтный стандарт изоформ, как это описано в данном документе. Масс-спектрометр 102 может осуществлять преобразование принятого образца молекул в ионы, в результате чего ионизированные формы образца молекул могут быть отфильтрованы и идентифицированы.

[0060] Обычно масс-спектрометр содержит источник ионов, масс-анализатор и детектор. Например, в случае источника 114 ионов осуществляют ионизацию (151) небольшого образца (например, образца 110) молекул или пептидов, обычно в катионы путем добавления одного или нескольких протонов. Масс-анализатор 116 осуществляет сортировку и разделяет ионы (например, ионы 152) в соответствии с их массой и зарядом. Детектор (например, детектор 140) осуществляет измерение разделенных ионы, и результаты могут записываться и визуально отображаться посредством вычислительного устройства (например, вычислительного устройства 142), имеющего один или несколько процессоров, например с помощью графика или другого отчета. Один или несколько процессоров могут быть частью прибора 100 с поддержкой МАМ или частью отдельного вычислительного устройства (например, вычислительного устройства 142).

[0061] Ионы 152 могут быть выявлены электронным способом посредством детектора 140, где ионы 152 обладают разной интенсивностью, за счет чего генерируются разные или варьирующие интенсивности ионов (т. е. сигналы), которые обнаруживает детектор 140. Ионы 152, обнаруженные детектором 140, могут считываться, сохраняться и/или анализироваться в вычислительном устройстве 142, где, например, обнаруженные ионы могут генерировать электронную информацию (например, площади пика регистрируемых ионов и т. д.). Таким образом, описываемый в данном документе прибор

100 с поддержкой МАМ может генерировать информацию об интенсивности ионов. Интенсивность ионов может быть отображена посредством двухмерных (2D) схемы, графика или записи, где, например, ось у масс-спектра такой схемы может представлять интенсивность сигнала ионов. Обычно величину соотношения массы и заряда (m/z) отмеряют на оси x схемы, графика или записи, где “m” означает молекулярное или атомное массовое число, а “z” означает зарядовое число иона.

[0062] Кроме того, коэффициент отклика может быть определен в анализе интенсивности/сигналов иона, генерируемых из информации MS. Коэффициент отклика может равняться соотношению сигнала ионной интенсивности, генерируемого молекулой или изоформой (например, что определенный по ионам 152), и количества молекулы или изоформы, которая генерирует сигнал. Коэффициенты отклика (например, k) и ионные интенсивности (например, I_i) далее описаны в данном документе, например, применительно к таблице 1.

[0063] Необходимо понимать, что ионизация молекул (например, изоформ) посредством масс-спектрометра может быть выполнена разными способами. Несмотря на то, что вариант осуществления масс-спектрометра на фигуре 1 представлен и описан одним таким способом, необходимо понимать, что любой масс-спектрометр или способ осуществления масс-спектрометрии может быть использован для систем и способов, описанных в данном документе. Например, масс-спектрометр 102 может содержать или иметь в своей основе масс-спектрометрическое инструментальное средство на основе Orbitrap, TOF (времени полета) и/или одного или трех квадруполей.

[0064] Вычислительное устройство 142 может содержать один или несколько процессоров и или одно или несколько компьютерных запоминающих устройств для считывания, хранения или анализа информации о молекулах, изоформах, референтных стандартах, ионах или другой информации, описанной в данном документе. Один или несколько процессоров и/или одно или несколько компьютерных запоминающих устройств вычислительного устройства 142 также могут быть использованы для реализации любых из функций, способов, блок-схем или других элементов, описанных в данном документе применительно к уменьшению изменчивости анализа МАМ между лабораториями или приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы. В дополнение или в качестве альтернативы прибор 100 с поддержкой МАМ может содержать один или несколько процессоров и/или одно или несколько компьютерных запоминающих устройств вычислительного устройства 142, которые также могут быть использованы для реализации любых из функций, способов, блок-схем или других элементов, описанных в данном документе применительно к уменьшению изменчивости анализа МАМ между лабораториями или приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, как описано в данном документе. На фигуре 1 показано, что вычислительное устройство 142 может быть коммутативно соединено с прибором 100 с поддержкой МАМ непосредственно (например, фиксировано соединено кабелем, таким как кабель универсальной последовательной шины (USB)) или

посредством компьютерной сети (или частной, или общего пользования, например посредством Интернет) и может быть коммутативно соединено с любым из компонентов масс-спектрометра 102, в том числе, например, с любым из источников 114 ионов, масс-анализатора 116 и/или детектора 140.

[0065] В частности, или прибор 100 с поддержкой МАМ, или вычислительное устройство 142 могут представлять собой вычислительное устройство, которое может содержать один или несколько процессоров, а также одно или несколько компьютерных запоминающих устройств. Запоминающие устройства могут включать одну или несколько форм энергозависимых и/или энергонезависимых, фиксированных и/или съемных запоминающих устройств, таких как постоянное запоминающее устройство (ROM), электронное программируемое постоянное запоминающее устройство (EPROM), оперативное запоминающее устройство (RAM), стираемое электронное программируемое постоянное запоминающее устройство (EEPROM) и/или другие жесткие диски, флеш-память, карты памяти формата «MicroSD» и другие. На запоминающих устройствах может храниться операционная система (OS) (например, Microsoft Windows, Linux, Unix и т. д.), имеющая возможность обеспечивать функциональные возможности, обсуждаемые в данном документе. На запоминающих устройствах также могут храниться машиночитаемые команды, включая любое из одного или нескольких приложений, одного или нескольких компонентов программного обеспечения и/или одного или нескольких прикладных программных интерфейсов (API), которые могут быть реализованы для упрощения или выполнения признаков, функций или другой информации, описанной в данном документе, такого как любые способы, процессы, элементы или ограничения, которые проиллюстрированы, представлены или описаны в различных блок-схемах, иллюстрациях, диаграммах, фигурах и/или другой информации в данном документе. Например, по меньшей мере некоторые из приложений, компонентов программного обеспечения или интерфейсов API могут представлять собой, содержать или иначе быть частью компонента машинного обучения и/или компонента поисковой оптимизации, где каждый из них приспособлен для обеспечения их различных функциональных возможностей, обсуждаемых в данном документе. Следует понимать, что могут предусматриваться одно или несколько других приложений, исполняемых процессором (процессорами) прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142.

[0066] Процессор(ы) прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 могут быть соединены с запоминающими устройствами прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 посредством компьютерной шины, отвечающей за передачу электронных данных, пакетов данных или других электронных сигналов к процессор(ам) и запоминающим устройствам и от них, для реализации или выполнения машиночитаемых команд, способов, процессов, элементов или ограничений, что проиллюстрировано, представлено или описано в различных блок-схемах, иллюстрациях, диаграммах, фигурах и/или другом содержимом данного документа.

[0067] Процессор(ы) прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 могут взаимодействовать с запоминающим устройством посредством компьютерной шины для запуска и выполнения операционной системы (OS). Процессор(ы) также могут взаимодействовать с запоминающим устройством посредством компьютерной шины, чтобы создавать, считывать, обновлять, удалять или иным способом осуществлять доступ к данным или воздействовать на данные, хранящиеся в запоминающих устройствах прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 и/или в базе данных прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 (например, реляционной базе данных, такой как Oracle, DB2, MySQL, или базе данных на основе NoSQL, такой как MongoDB). Данные, хранящиеся в запоминающих устройствах и/или в базах данных, могут включать все или часть любых данных или информации, описанных в данном документе, включая, например, один или несколько поисковых запросов, одну или несколько подробностей транзакции и информацию профиля пользователя.

[0068] Прибор 100 с поддержкой МАМ или вычислительное устройство 142 может дополнительно содержать компонент связи, приспособленный для передачи (например, отправки и приема) данных через один или несколько внешних/сетевых портов в одну или несколько сетей или локальных терминалов, таких как компьютерная сеть и/или вычислительное устройство 142, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления компонент связи может включать технологию клиент-серверной платформы, такую как ASP.NET, Java J2EE, Ruby on Rails, Node.js, веб-сервис или онлайн API, отвечающие за прием электронных запросов и ответы на них. Процессор(ы) прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 могут реализовывать компонент связи прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142, которые могут взаимодействовать с тем, чтобы реализовывать или выполнять машиночитаемые команды, способы, процессы, элементы или ограничения, что проиллюстрировано, представлено или описано в различных блок-схемах, иллюстрациях, диаграммах, фигурах и/или другом содержанием данного документа. Согласно некоторым вариантам осуществления компонент связи прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 может включать в себя один или несколько приемопередатчиков (например, приемопередатчиков WWAN, WLAN и/или WPAN), или взаимодействовать с ними, которые функционируют в соответствии со стандартами IEEE, стандартами 3GPP или другими стандартами и которые могут быть использованы для приема и передачи данных через внешние/сетевые порты прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142.

[0069] Прибор 100 с поддержкой МАМ или вычислительное устройство 142 могут дополнительно содержать или реализовывать интерфейс оператора, приспособленный для представления информации администратору или оператору и/или к приему входных сигналов от администратора или оператора. Интерфейс оператора прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 может предоставлять экран

дисплея (например, посредством вычислительного устройства 142 106). Любой из прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 может также предоставлять компоненты ввода/вывода (например, порты, емкостные или сенсорные панели ввода, клавиши, кнопки, лампы, светодиоды), которые могут находиться в прямом доступе через любой из прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 или быть подключены к ним или же могут находиться в опосредованном доступе через терминал прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 или быть подключены к нему. Согласно некоторым вариантам осуществления администратор или оператор может осуществлять доступ к серверу 102 посредством интерфейса оператора прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 и/или компонентов ввода/вывода, чтобы просматривать информацию, вносить изменения, вводить обучающие данные и/или выполнять другие функции.

[0070] В некоторых вариантах осуществления любой из прибора 100 с поддержкой МАМ или вычислительного устройства 142 может выполнять функции, описанные в данном документе, в качестве части “облачной” сети или может иначе осуществлять связь с другими компонентами аппаратного или программного обеспечения в пределах облака, чтобы отправлять, принимать или иным способом анализировать данные или информацию, описанные в данном документе.

[0071] В целом компьютерная программа или продукт на основе компьютера согласно некоторым вариантам осуществления может содержать применимый к использованию в компьютере носитель данных или материальный энергонезависимый машиночитаемый носитель (например, стандартное оперативное запоминающее устройство (RAM), оптический диск, привод универсальной последовательной шины (USB) или им подобные), на которых записаны машиночитаемый программный код или компьютерные команды, при этом машиночитаемый программный код или компьютерные команды могут быть установлены на прибор 100 с поддержкой МАМ или вычислительное устройство 142 или иным способом адаптированы для выполнения их процессором (процессорами) (например, работая в связи с соответствующей операционной системой на запоминающих устройствах), чтобы обеспечивать, реализовывать или выполнять машиночитаемые команды, способы, процессы, элементы или ограничения, проиллюстрированные, представленные или описанные в различных блок-схемах, иллюстрациях, диаграммах, фигурах и/или другом содержимом данного документа. В этом отношении программный код может быть реализован на любом требуемом языке программирования и может быть реализован в качестве машинного кода, ассемблерного кода, битового кода, интерпретируемого исходного кода или им подобных (например, на Golang, Python, C, C++, C#, Objective-C, Java, Scala, Actionscript, Javascript, HTML, CSS, XML и т. д.).

[0072] На фигуре 2 показана иллюстративная технологическая схема для уменьшения изменчивости между первым прибором 210 с поддержкой МАМ и вторым прибором 260 с поддержкой МАМ посредством калибровок интенсивности сигналов в

ходе работы согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе. В некоторых вариантах осуществления первый прибор 210 с поддержкой МАМ и второй прибор 260 с поддержкой МАМ могут быть расположены в одной лаборатории. В других вариантах осуществления первый прибор 210 с поддержкой МАМ и второй прибор 260 с поддержкой МАМ могут быть расположены в разных лабораториях. Например, первый прибор 210 с поддержкой МАМ может быть расположен в первой лаборатории в первом географическом местоположении, а второй прибор 260 с поддержкой МАМ может быть расположен во второй лаборатории во втором географическом местоположении. В некоторых вариантах осуществления первый прибор 210 МАМ может быть соединен с возможностью осуществления связи с одним или несколькими процессорами, связанными со вторым прибором MS, по компьютерной сети, как описано применительно к фигуре 1.

[0073] Каждый из первого прибора 210 с поддержкой МАМ и второго прибора 260 с поддержкой МАМ может быть сконфигурирован одинаково или аналогично описанному для прибора 100 с поддержкой МАМ, представленного на фигуре 1. Соответственно, описание применительно к фигуре 1 одинаковым или подобным образом применимо и к любому из первого прибора 210 с поддержкой МАМ и/или второго прибора 260 с поддержкой МАМ. Кроме того, каждый из первого прибора 210 с поддержкой МАМ и второго прибора 260 с поддержкой МАМ может содержать вычислительное устройство (например, вычислительное устройство 142), как описано применительно к фигуре 1. В различных вариантах осуществления первый прибор 210 с поддержкой МАМ и второй прибор 260 с поддержкой МАМ могут представлять собой или содержать масс-спектрометрические (MS) приборы, описанные применительно к фигуре 1. В других вариантах осуществления первый прибор 210 с поддержкой МАМ и второй прибор 260 с поддержкой МАМ могут представлять собой или содержать трехквadrupольные приборы.

[0074] В варианте осуществления, представленном на фигуре 2, первый прибор 210 с поддержкой МАМ содержит первый детектор (например, детектор 140, описанный в данном документе применительно к фигуре 1). Кроме того, первый прибор 210 с поддержкой МАМ характеризуется состоянием первого прибора, определенным (1) моделью первого прибора или (2) первым набором настроек. Для приборов с поддержкой МАМ, описанных в данном документе, модель прибора может определять то, как прибор с поддержкой МАМ анализирует, считывает или иным способом выдает сообщения о молекулах, изоформах, ионах или другую связанную информацию, описанную в данном документе. Например, иллюстративный вариант осуществления модели прибора или конфигурация для ионизирующих молекул, описаны в данном документе для прибора 100 с поддержкой МАМ, представленного на фигуре 1. Аналогично приборы с поддержкой МАМ могут иметь набор настроек для прибора с поддержкой МАМ, который может влиять на работу прибора с поддержкой МАМ. Например, настройки могут изменять то, как прибор с поддержкой МАМ выполняет ионизацию и/или изменяет чувствительность того, как ионы считываются, или обнаруживаются, или иным способом сообщается о них.

Отличия в любом из модели прибора или настроек прибора могут привести к тому, что прибор с поддержкой МАМ будет функционировать по-другому, что может послужить причиной того, что прибор с поддержкой МАМ будет обнаруживать и/или считывать молекулы, изоформы, ионы иным способом. Таким образом, приборы с поддержкой МАМ с разными моделями прибора или настройками прибора могут характеризоваться разными состояниями и, следовательно, могут работать по-разному от прибора к прибору и/или от лаборатории к лаборатории, в которых могут располагаться такие разные приборы.

[0075] В варианте осуществления, представленном на фигуре 2, первый прибор 210 с поддержкой МАМ приспособлен для приема первого образца 204 (например, образца протеолитического пептида) и референтного стандарта 202 (например, протеолитического пептида). В варианте осуществления, представленном на фигуре 2, концентрация атрибута (например, атрибута качества) в первом образце 204 является неизвестной. Однако в референтном стандарте 202 концентрация атрибута является известной и поэтому он может быть использован в качестве калибранта. Например, референтный стандарт может представлять собой химический образец, который характеризуется определенным известным химическим составом, например, образец с определенным номером партии или “партия” может характеризоваться содержанием первого химического вещества или атрибута, составляющим 80%, второго химического вещества или атрибута, составляющим 10%, и различными незначительными процентными долями других остаточных химических веществ или атрибутов. Референтный стандарт может характеризоваться таким же составом химических веществ или атрибутов и/или такой же сигнатурой сигнала (которая, например, детектируется посредством масс-спектрометра, как описано применительно к фигуре 1), как и другие образцы референтного стандарта такого же химического вещества или состава. Таким образом, референтный стандарт может быть использован в целях контроля качества, где тестовый образец (например, первый образец 204 и/или второй образец 254) сравнивают с референтным стандартом (например, референтным стандартом 202 и/или референтным стандартом 252), чтобы определять качество, количество, согласованность, вариацию и/или расхождение между тестовым образцом и референтным стандартным образцом или партией. Например, для белка эпоэтин-альфа (рекомбинантного эритропоэтина) (например, Erogen® от Amgen) может быть предоставлена партия референтного стандарта, которая может быть использован для сравнения партий тестовых образцов эпоэтина для проведения измерений контроля качества.

[0076] Как показано на фигуре 2, посредством первого прибора 210 с поддержкой МАМ референтный стандарт 202 анализируют параллельно с образцом 204. Аналогично для второго прибора 260 с поддержкой МАМ референтный стандарт 252 анализируют параллельно со вторым образцом 254. В случае референтных стандартов 202 и 252 большинство атрибутов качества остаются постоянными в ходе всего срока использования каждого референтного стандарта и поэтому служат общим калибрantom для корректировки отличия (отличий) между приборами или процедурами подготовки

образцов, например, отличия (отличий) в состояниях между первым прибором 210 с поддержкой и вторым прибором 260 с поддержкой МАМ и/или процедурами подготовки образцов, выполняемыми химиками-аналитиками, работающими с первым прибором 210 с поддержкой и/или вторым прибором 260 с поддержкой.

[0077] В данном документе описано, что выгода от использования референтного стандарта в качестве калибранта при каждом рабочем цикле (например, где референтные стандарты 202 и 252 могут представлять собой образцы одного и того же референтного стандарта, используемого в качестве калибранта), заключается в том, что можно устранить большинство требований для традиционного МАМ в плане воспроизводимости между лабораториями и приборами. Например, допущения относительно воспроизводимости между лабораториями и приборами могут быть упрощены и пересмотрены следующим образом: (1) немодифицированные и модифицированные пептиды характеризуются воспроизводимой степенью извлечения в одной и той же последовательности LC/MS (например, при сравнении от лаборатории к лаборатории); (2) немодифицированные и модифицированные пептиды характеризуются воспроизводимым коэффициентом отклика MS в одной и той же последовательности LC/MS (например, при сравнении с таким же коэффициентом отклика); (3) искусственно вносимые изменения характеристики являются незначительными. Вышеуказанные требования проще выполнить по сравнению с требованиями традиционного способа, поскольку большинство требований по воспроизводимости между лабораториями ослабляются до воспроизводимости в пределах одного цикла LC/MS (например, в одной лаборатории, у одного химика-аналитика и в один и тот же день).

[0078] Как показано в варианте осуществления на фигуре 2, первый прибор 210 с поддержкой МАМ приспособлен для обнаружения посредством своего первого детектора изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте. В контексте протеолитических пептидов изоформа белка может представлять собой вариант белка, являющийся представителем набора белков с высокой степенью подобия, которые выполняют одинаковую или схожие биологические роли. В некоторых вариантах осуществления изоформа первого образца может представлять собой атрибут качества, используемый для контроля качества, как это описано в данном документе. В других вариантах осуществления атрибут качества может быть белком, или идентифицированной примесью, или другой мерой определения качества образца или лота. Например, в различных вариантах осуществления атрибут качества может определяться фрагментацией, окислением, гликированием, гидроксилированием, вариантами последовательности, изомеризацией, дезаминированием, С-концевым лизином, О-связанными гликанами и/или N-концевыми гликанами.

[0079] Первый прибор 210 с поддержкой МАМ может быть связан с одним или несколькими процессорами. Один или несколько процессоров могут содержаться в первом приборе 210 с поддержкой МАМ или могут быть частью вычислительного устройства (например, вычислительного устройства 142), коммутативно соединенного с первым

прибором 210 с поддержкой МАМ, как это описано, например, применительно к фигуре 1.

[0080] В варианте осуществления, представленном на фигуре 2, один или несколько процессоров, связанных с первым прибором 210 с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца. Необходимо понимать, что определение набора поправочных коэффициентов может быть выполнено до, в ходе или после первой итерации МАМ так, что определение набора поправочных коэффициентов связано с первой итерацией МАМ. Также необходимо понимать, что набор поправочных коэффициентов, описанный в данном документе, может содержать единственный поправочный коэффициент или совокупность поправочных коэффициентов. В варианте осуществления, представленном на фигуре 2, первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте 202. Эта взаимосвязь может быть выражена посредством следующего уравнения (1) для $n+1$ изоформ, ассоциированных с конкретным аминокислотным остатком, где a_i представляет первый набор поправочных коэффициентов и I^0 и A^0 представляют значения интенсивности ионов и количественных показателей атрибутов для референтного стандарта 202.

$$\begin{cases} a_i = \frac{I_i^0}{I_0^0} \frac{A_0^0}{A_i^0}, i = 0, n \\ A_i = \frac{I_i / a_i}{\sum_{j=0}^n \frac{I_j}{a_j}}, i = 0, n \end{cases} \quad (1)$$

[0081] Таким образом, референтный стандарт (например, представленный посредством I^0 и A^0) используют в качестве калибранта, где первый набор поправочных коэффициентов (например, a_i) определяют по таким значениям. Как показано для уравнения (1), первый набор поправочных коэффициентов (например, a_i) основан на значениях интенсивности ионов (например, I_0^0 и I_i^0) первой изоформы (изоформ) референтного стандарта и значениях количественных показателей в первом референтном стандарте (например, A_0^0 и A_i^0) первой изоформы (изоформ) референтного стандарта. В таблице 1 ниже описаны различные обозначения, используемые для уравнения (1), и/или как используются в других местах данного документа:

ТАБЛИЦА 1

Обозначение	Описание
Верхний индекс 0	Значения с верхним индексом 0 представляют значения референтного стандарта (например, образцы 202 или 252 референтного стандарта)
A^0	Представляет известный количественный показатель изоформы в референтном стандарте (например, образцах 202 или 252 референтного стандарта)

I^0	Представляет измеренную интенсивность ионов референтного стандарта (например, образцов 202 или 252 референтного стандарта)
Нижние индексы $0, 1, 2, \dots, i, \dots, n$	Нижний индекс $0, 1, 2, \dots, i, \dots, n$ представляет $n+1$ изоформ по заданному остатку (включая немодифицированную форму). Нижний индекс 0 представляет наиболее распространенную форму в референтном стандарте (например, в образцах 202 или 252 референтного стандарта), которая обычно представляет собой немодифицированную форму
k_i	Представляет коэффициент отклика изоформы i
a_i	Представляет поправочный коэффициент (например, поправочный коэффициент для коэффициента отклика) для изоформы i
a_0	Значение a_0 определено равным 1
A_i	Представляет количественный показатель изоформы i
I_i	Представляет интенсивность ионов (площадь пика) изоформы i

[0082] Уравнение (1) может быть использовано для выполнения калибровки интенсивности (например, калибровки интенсивности ионов) исходя из известного количественного показателя атрибута в референтном стандарте (A_i^0).

[0083] Кроме того, первый набор поправочных коэффициентов (например, a_i) может быть использован для калибровки коэффициента отклика (k), связанного с первым набором значений количественных показателей в образце (например, A_i), для определения значения (значений) интенсивности ионов (I_i) изоформы (изоформ) первого образца. Это показано в уравнении (2) ниже. В целом значения интенсивности ионов могут представлять площади пиков, согласно обнаруженному посредством MS-детектора 140, как описано применительно к фигуре 1. Ниже показано, что поправочный коэффициент a_i может быть использован для калибровки коэффициента отклика k , который при использовании применительно к значению количественного показателя (A_i) обеспечивает калибровку коэффициента интенсивности ионов I_i . Это показано в уравнении (2) ниже, из которого выведено уравнение (1):

$$\begin{cases} a_i k^0 A_i^0 = I_i^0, i = 0, n \\ a_i k A_i = I_i, i = 0, n \\ a_0 = 1 \\ \sum_{j=0}^n A_j = 1 \end{cases} \quad (2)$$

[0084] В уравнении (2) коэффициент отклика (k) для каждой изоформы (i) модифицируется поправочным коэффициентом (a_i). Формула $a_i k^0$ представляет

скорректированный коэффициент отклика для референтного стандарта (например, 202), и $a_{i,k}$ представляет скорректированный коэффициент отклика для образца (например, первого образца 204). Коэффициент отклика для референтного стандарта (k^0) может отличаться от коэффициента отклика первого образца 204 (k) вследствие небольших отличий в приготовлении образца, а также отличий в чувствительности прибора между введениями (например, отличия в пределах лаборатории). Аналогично отличия также могут быть привнесены или возникнуть между первым образцом 204 и вторым образцом 254 (например, отличие между лабораториями). В уравнении (2) показано, что в некоторых вариантах осуществления поправочный коэффициент a_0 задают равным 1 ($a_0=1$), чтобы решить уравнение (2) для выведения уравнения (1). Однако необходимо понимать, что неважно, какая изоформа установлена в постоянное значение ($a_0=1$); однако обычно устанавливают наиболее распространенную изоформу, которая обычно представляет собой немодифицированную изоформу.

[0085] Значение количественного показателя (A_i^0) каждого атрибута в референтном стандарте может быть установлено или с использованием традиционного МАМ, или ортогонального метода с лучшей точностью. Если применяется способ абсолютного количественного определения, все последующие анализы МАМ того же атрибута становятся абсолютным измерением после калибровки.

[0086] Уравнения (1) и (2) могут быть использованы для вычисления значения количественного показателя (A_i) каждой изоформы i в образце (например, первом образце 204). Например, для уравнения (1) показано, что значение количественного показателя (A_i) изоформы i определяют из значений, включающих поправочный коэффициент (например, a_i) и интенсивность сигнала каждой изоформы (например, изоформы I_i).

[0087] В варианте осуществления, представленном на фигуре 2, один или несколько процессоров, связанных с первым прибором 210 с поддержкой МАМ, могут дополнительно быть приспособлены для определения первого набора значений количественных показателей в образце (например, A_i , как показано для уравнения (1)), соответствующего изоформе (изоформам) первого образца, где первый набор значений количественного показателя в образце (например, A_i , как показано для уравнения (1)) основан на первом наборе поправочных коэффициентов (например, a_i в уравнении (1)). Как описано в данном документе, значения количественных показателей могут представляться в виде процентных долей. Как показано для уравнения (1), первый набор значений количественных показателей в образце (например, A_i) также основан на значении (значениях) интенсивности ионов изоформы (изоформ) первого образца (например, I_i в уравнении (1)).

[0088] На фигуре 2 также представлена иллюстрация калибровки второго прибора 260 с поддержкой МАМ. Второй прибор 260 с поддержкой МАМ калибруют (270) с использованием такого же референтного стандарта (или другого образца такого же референтного стандарта), который используют для калибровки (220) первого прибора 210 с поддержкой МАМ. Таким образом, как второй прибор 260 с поддержкой МАМ, так и

первый прибор 210 с поддержкой МАМ дают согласующиеся результаты, что может быть показано в отчете 280. Необходимо понимать, что второй прибор 260 с поддержкой МАМ приспособлен и откалиброван так же или подобно тому, как это описано для первого прибора 210 с поддержкой МАМ, включая использование такого же референтного стандарта (где, например, референтный стандарт 202 и референтный стандарт 252 являются образцами одного и того же референтного стандарта), поэтому описание в данном документе калибровки (например, в том числе посредством уравнений (1) и (2)) в равной степени применимо как для второго прибора 260 с поддержкой МАМ, как и для первого прибора 210 с поддержкой МАМ.

[0089] Второй прибор 260 с поддержкой МАМ содержит второй детектор (например, детектор 140, описанный в данном документе применительно к фигуре 1). В варианте осуществления, представленном на фигуре 2, второй прибор 260 с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек. Как описано в данном документе, состояние второго прибора для второго прибора 260 с поддержкой МАМ может отличаться от состояния первого прибора для первого прибора 210 с поддержкой МАМ. В некоторых вариантах осуществления состояние второго прибора может отличаться от состояния первого прибора потому, что второй прибор 260 с поддержкой МАМ может характеризоваться моделью второго прибора, которая отличается от модели первого прибора для прибора 210 с поддержкой МАМ. В других вариантах осуществления состояние второго прибора может отличаться от состояния первого прибора потому, что второй прибор 260 с поддержкой МАМ может иметь второй набор настроек, который отличается от первого набора настроек для первого прибора 210 с поддержкой МАМ.

[0090] Второй прибор 260 с поддержкой МАМ приспособлен для приема второго образца 254 (например, образца протеолитического пептида) и референтного стандарта 252 (например, протеолитического пептида). Референтный стандарт 252 может быть другим образцом того же референтного стандарта, который используется для референтного стандарта 202. Второй прибор 260 с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен для обнаружения посредством второго детектора (например, детектора 140, описанного в данном документе применительно к фигуре 1) изоформы второго образца (i) во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте. Необходимо понимать, что в некоторых вариантах осуществления каждый из первого образца, второго образца и референтного образца может быть связан с общим протеолитическим пептидом, поэтому первый образец представляет собой заданный протеолитический пептид, второй образец протеолитического пептида, и референтный стандарт представляет собой протеолитический пептид.

[0091] Второй прибор 260 с поддержкой МАМ связан с одним или несколькими процессорами. В некоторых вариантах осуществления один или несколько процессоров являются частью одного вычислительного устройства (например, вычислительного

устройства 142), поэтому один или несколько процессоров, связанных с первым прибором 210 с поддержкой МАМ, являются теми же одним или несколькими процессорами, которые связаны со вторым прибором 260 с поддержкой МАМ. В других вариантах осуществления один или несколько процессоров являются частями разных вычислительных устройств.

[0092] Один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором 260 с поддержкой, приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов (например, a_i), соответствующего изоформе (изоформам) второго образца (i). Необходимо понимать, что определение набора поправочных коэффициентов (например, a_i) может быть выполнено до, в ходе или после второй итерации МАМ так, что определение набора поправочных коэффициентов связано со второй итерацией МАМ. В варианте осуществления, представленном на фигуре 2, второй набор поправочных коэффициентов (например, a_i) основан на референтном стандарте 252, который является тем же референтным стандартом, что и референтный стандарт 202. Один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором 260 с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения второго набора значений количественных показателей в образце (например, A_i), соответствующего изоформе (изоформам) второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце (например, A_i) основан на втором наборе поправочных коэффициентов (например, a_i).

[0093] С учетом поправочных коэффициентов, определенных для каждого из первого прибора 210 с поддержкой МАМ и второго прибора 260 с поддержкой МАМ, которые откалиброваны посредством общих референтных стандартов 202 и 252, как это описано в данном документе, между первым прибором 210 на основе МАМ и вторым прибором 260 на основе МАМ можно уменьшить изменчивость измерений, когда один и тот же образец анализируют посредством обоих приборов. Уменьшенная изменчивость может быть продемонстрирована посредством согласующихся результатов МАМ в отчете 280. Например, величина (величины) вариации, определенная по первому набору значений количественных показателей в образце (например, A_i) и второму набору значений количественных показателей в образце (например, A_i), может быть уменьшена с учетом использования первого набора поправочных коэффициентов (например, a_i) для первого прибора 210 с поддержкой МАМ и второго набора поправочных коэффициентов (например, a_i) для второго прибора 260 с поддержкой МАМ, как это описано в данном документе. Как это описано в данном документе, в некоторых случаях значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце может быть уменьшена на по меньшей мере 25 процентов.

[0094] Таким образом, как представлено применительно к фигуре 2, образцы 204 и 254 и общий референтный стандарт (например, 202 и 252) могут быть проанализированы параллельно для калибровки (220 и 270) первого прибора 210 с поддержкой МАМ и второго прибора 260 с поддержкой МАМ соответственно. Таким образом, отчет 280,

сообщающий концентрацию каждого атрибута качества в образце, может быть сгенерирован с использованием известной концентрации в референтном стандарте (например, 202 и 252), чтобы добиваться согласующихся результатов даже с помощью разных инструментальных средств, например, инструментальных средств, имеющих разные состояния, описанные в данном документе. Например, каждый из первого прибора 210 с поддержкой МАМ и первого прибора 216 с поддержкой МАМ может быть приспособлен для генерации отчета (например, отчета 280), содержащего, или иным образом описывающего, или сообщающего об изоформах и/или атрибуте (атрибутах) качества. Например, отчет 280 может содержать информацию и данные, представленные в виде схемы, и может содержать такие данные и информацию, как коэффициенты отклика, площади пиков или другую информацию, например, как это описано применительно к фигуре 1. В различных вариантах осуществления отчет 280 может быть сгенерирован после калибровки (220 или 270) с использованием референтного стандарта 202 или 252, как это описано в данном документе.

[0095] Фигура 3 представляет собой иллюстрацию способа 300 для уменьшения изменчивости прибора с поддержкой МАМ (например, прибора 100 с поддержкой МАМ) для нескольких периодов времени посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе. Необходимо понимать, что прибор с поддержкой МАМ, описанный на фигуре 3, приспособлен и откалиброван таким же или аналогичным образом, как это описано для первого прибора 210 с поддержкой МАМ, представленного на фигуре 2, включая использование референтного стандарта так, как раскрыто в данном документе для калибровки (например, в том числе посредством уравнений (1) и (2)) в равной степени применимо для прибора с поддержкой МАМ, описанного на фигуре 3. Однако, что касается фигуры 3, один и тот же прибор с поддержкой МАМ используется в разные периоды времени (например, в разные циклы, разные итерации МАМ и/или разные дни, часы и т. д.). Прибор с поддержкой МАМ, описанный на фигуре 3, может быть приспособлен так, как это описано для прибора 100 с поддержкой МАМ, представленного на фигуре 1.

[0096] Способ 300 начинается (302) в блоке 304, где прибор с поддержкой МАМ, описанный на фигуре 3, в течение первого периода времени может принимать первый образец (например, образец 204, который может представлять собой протеолитический пептид) и референтный стандарт (например, референтный стандарт 202, который может представлять собой протеолитический пептид).

[0097] В блоке 306 прибор с поддержкой МАМ посредством детектора (например, детектора 140) может в течение первого периода времени определять изоформу первого образца (i) в первом образце и первую изоформу референтного стандарта в референтном стандарте.

[0098] В блоке 308 один или несколько процессоров (например, один или несколько процессоров, описанных применительно к фигуре 1) могут быть

приспособлены посредством первой итерации МАМ в течение первого периода времени для определения первого набора поправочных коэффициентов (например, a_i), соответствующего изоформе (изоформам) первого образца (i), где первый набор поправочных коэффициентов (например, a_i) основан на референтном стандарте.

[0099] В блоке 310 один или несколько процессоров также могут быть приспособлены для определения посредством первой итерации МАМ и в течение первого периода времени первого набора значений количественных показателей в образце (например, A_i), соответствующего изоформе (изоформам) первого образца (i). Первый набор значений количественных показателей в образце может быть основан на первом наборе поправочных коэффициентов (например, a_i). Прибор с поддержкой МАМ в течение первого периода времени может характеризоваться состоянием первого прибора, заданным первым набором настроек. Состояние первого прибора может быть таким же или аналогичным тому, которое описано применительно к фигуре 2.

[00100] В блоке 312 прибор с поддержкой в течение второго периода времени может принимать второй образец (например, который может представлять собой протеолитический пептид) и референтный стандарт (например, который может представлять собой протеолитический пептид).

[00101] В блоке 314 прибор с поддержкой МАМ может обнаруживать посредством детектора (например, детектора 140) в течение второго периода времени изоформу второго образца (i) во втором образце и вторую изоформу референтного стандарта в референтном стандарте.

[00102] В блоке 316 один или несколько процессоров могут быть приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ в течение второго периода времени второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе (изоформам) второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте.

[00103] В блоке 318 один или несколько процессоров также могут быть приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ и в течение второго периода времени второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе (изоформам) второго образца. Второй набор значений количественных показателей в образце может быть основан на втором наборе поправочных коэффициентов. Прибор с поддержкой МАМ в течение второго периода времени может характеризоваться состоянием второго прибора, определенным вторым набором настроек. Состояние второго прибора с поддержкой МАМ в течение первого периода времени может отличаться от состояния второго прибора с поддержкой МАМ в течение второго периода времени.

[00104] Учитывая поправочные коэффициенты, определенные для каждого периода времени, изменчивость измерений между итерациями МАМ в течение первого периода времени и второго периода времени можно уменьшить. Например, значение (значения) вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго

набора значений в образце могут быть уменьшены с учетом первого набора поправочных коэффициентов для первого прибора с поддержкой MAM и второго набора поправочных коэффициентов для второго прибора с поддержкой MAM.

[00105] Варианты осуществления, представленные на фигурах 4a и 4b, описанные в данном документе, иллюстрируют анализ белка P1 с использованием сокращения вариации и калибровки, как это описано в данном документе. P1 содержит два сайта O-связанного гликозилирования в одной части молекулы с 6 разными гликоформами (изоформами), каждая из которых представлена на фигуре 4b в данном документе. Диаграммы 400 и 450, представленные на фигурах 4a и 4b соответственно, были созданы путем анализа образца P1 вместе с его референтным стандартом разными химиками-аналитиками с использованием разных приборов LC/MS, в том числе прибора Q Exactive™ BioPharma Platform и двух приборов Exactive™ Plus Orbitrap Mass Spectrometer, каждый произведенный компанией ThermoFisher Scientific (Сан-Хосе, Калифорния). Все данные были обработаны на программном обеспечении Chromeleon™, предоставленном компанией «ThermoFisher Scientific», для определения площадей пиков каждого пептида, представляющего интерес. Значения количественных показателей (например, A_i), представленные для каждой гликоформы на фигурах 4a и 4b, были количественно определены с использованием итераций (402) традиционного MAM, а также итераций (404) нового калиброванного MAM. Процедуры (404) нового калиброванного MAM основаны на методиках калибровки для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (MAM) между лабораториями или приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, как это описано в данном документе. Для получения значений количественных показателей (например, A_i^0) каждого атрибута в референтном стандарте P1 референтный стандарт P1 анализировали посредством итераций (402) традиционного MAM шесть раз и среднее значение этих шести измерений использовали в качестве известного количественного показателя в эталонном стандарте.

[00106] Фигура 4a представляет собой диаграмму 400, описывающую уменьшение вариации значений количественных показателей (например, A_i) для заданной изоформы между приборами/между лабораториями в пределах шести иллюстративных итераций MAM. Например, на оси y 410y диаграммы 400 показаны значения количественных показателей (например, A_i) в процентных долях. На оси x 410x диаграммы 400 показано шесть иллюстративных итераций 1-6 MAM, на которых традиционные значения количественных показателей в образце, определенные посредством итераций (402) традиционного MAM, сравниваются с калиброванными значениями количественных показателей, определенными с использованием итераций (404) нового калиброванного MAM, как это описано для различных вариантов осуществления, раскрытых в данном документе. Например, итерации 1-6 MAM могут представлять собой итерации MAM, проведенные на разных MAM-приборах (например, на первом приборе 210 с поддержкой MAM и втором приборе 260 с поддержкой MAM, описанных применительно к фигуре 2)

или итерации 1-6 МАМ могут представлять собой итерации МАМ, проведенные в разные периоды времени на одном и том же приборе с поддержкой МАМ (например, как это описано для фигуры 3).

[00107] В частности, в варианте осуществления, представленном на фигуре 4а, на диаграмме 400 показаны измеренные значения количественных показателей (например, A_i) для гликоформы (изоформы), которые определены с использованием как итераций (402) традиционного МАМ, так и итераций (404) нового калиброванного МАМ. В частности, гликоформа на диаграмме 400 представляет сиаловую кислоту 2-го ядра (SA). Итерации 1-3, показанные на оси x 410x, измеряли посредством первого прибора с поддержкой МАМ, т. е. первого прибора Exactive™ Plus Orbitrap Mass Spectrometer. Итерации 4-6, показанные на оси x 410x, измеряли посредством другого, второго прибора с поддержкой МАМ, т. е. другого прибора Exactive™ Plus Orbitrap Mass Spectrometer. На диаграмме 400 показано, что изменчивость между приборами значений количественных показателей (например, A_i) в пределах каждой итерации 1-6 при использовании процедур (404) нового калиброванного МАМ значительно уменьшилась по сравнению с изменчивостью значений количественных показателей в пределах каждой итерации 1-6 при использовании процедур (402) традиционного МАМ. Иными словами, согласованность значений количественных показателей (например, A_i) между приборами в пределах каждой итерации 1-6 при использовании процедур (404) нового калиброванного МАМ значительно улучшается по сравнению с изменчивостью значений количественных показателей в пределах каждой итерации 1-6 с использованием процедур (402) традиционного МАМ.

[00108] На фигуре 4b представлена диаграмма, изображающая уменьшение отклонений между приборами/между лабораториями по шести иллюстративным изоформам, включая изоформу, представленную на фигуре 4а, согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе. На оси y 460y диаграммы 450 показано относительное стандартное отклонение (RSD) внутрилабораторной прецизионности в процентных долях. RSD коррелирует со значениями количественных показателей (например, A_i). В частности, уменьшение RSD показывает уменьшение изменчивости значений количественных показателей.

[00109] На оси x 460x диаграммы 400 показаны шесть иллюстративных изоформ (1HexNAc, 1Core, 1SA, 2SA, SA 2-го ядра и негликозилированная изоформа). Анализ для изоформы SA 2-го ядра показан для фигуры 4а, как описано в данном документе. На фигуре 4b показано процентное уменьшение относительного стандартного отклонения (RSD) (например, гликоформ) по каждой из шести изоформ, о чем свидетельствует сравнение итераций (402) традиционного МАМ с итерациями (404) нового калиброванного МАМ. Каждая из шести изоформ может быть использована как качественные атрибуты для проверки контроля качества партий заданного образца (например, P1). Поэтому согласованность (т. е. уменьшенная изменчивость/уменьшенное отклонение) при измерениях одного и того же образца является важной. Посредством

диаграммы 450 на фигуре 4b показано, что итерации (404) нового калиброванного МАМ значительно уменьшают RSD (например, от двух до трех раз), от максимум 25% до максимум 5%, даже в случае измерения гликоформ Р1 на разных приборах.

[00110] Варианты осуществления, представленные на фигурах 5a и 5b, описанные в данном документе, иллюстрируют анализ атрибутов второго белка Р2. В частности, применительно к диаграммам 500 и 550, представленным на фигурах 5a и 5b, референтный стандарт Р2 инкубировали при 40°C в течение 4 недель. Затем 20% данного подвергнутого стрессовому воздействию образца добавляли в референтный стандарт Р2 для получения тестового образца. Данный тестовый образец вместе как с эталонным стандартом Р2, так и с подвергнутым стрессовому воздействию образцом расщепляли трипсином следуя двум разным протоколам, и каждый продукт расщепления анализировали трехкратно на двух разных приборах LC/MS с разными колонками, подвижной фазой и градиентом. Прибор Thermo Q Exactive™ BioPharma Platform использовали в качестве первого прибора с поддержкой МАМ, а Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ Mass Spectrometer (ThermoFisher Scientific) в качестве второго прибора с поддержкой МАМ. Референтный стандарт Р2 анализировали на первом приборе с поддержкой МАМ шесть раз и среднее измеренное значение количественного показателя каждого атрибута использовали в качестве стандартного значения количественного показателя. Все получаемые данные и информацию анализировали для получения площади пиков, соответствующих каждой изоформе пептида, и связанные значения количественных показателей.

[00111] Кроме того, что касается фигур 5a и 5b, то проанализировали 57 атрибутов качества для Р2. Например, 57 атрибутов качества включают фрагментацию, окисление, гликирование, гидроксилирование, варианты последовательности, изомеризацию, дезаминирование, С-концевой лизин, О-связанные гликаны и/или N-связанные гликаны. Данные атрибуты качества охватывали широкий спектр значений количественных показателей от 0,005% до 5%.

[00112] На фигуре 5a представлена диаграмма 500, описывающая уменьшение вариации значений количественных показателей (например, A_i) между приборами/между лабораториями по двенадцати примерным итерациям МАМ. Например, на оси y 510y диаграммы 500 показаны значения количественных показателей (например, A_i) в процентных долях. На оси x 510x диаграммы 500 показано двенадцать иллюстративных итераций 1-12 МАМ, на которых стандартные значения количественных показателей для образца, определенные посредством итераций (402) традиционного МАМ, сравниваются с калиброванными значениями количественных показателей, определенными с использованием итераций (404) нового калиброванного МАМ, что описано для различных вариантов осуществления, раскрытых в данном документе. Например, итерации 1-12 МАМ могут быть итерациями МАМ, выполняемыми с использованием разных приборов (например, первого МАМ-прибора 210 и второго прибора 260 с поддержкой МАМ, как описано для фигуры 2), или итерации 1-12 МАМ могут быть итерациями МАМ,

выполняемыми с использованием разных периодов времени на одном и том же МАМ-приборе (как, например, описано для фигуры 3).

[00113] А именно, в варианте осуществления, представленном на фигуре 5а, на диаграмме 500 показаны измеренные значения количественных показателей (например, A_i) для гидроксирования K117, что определено с использованием как итераций (402) традиционного МАМ, так и итераций (404) нового калиброванного МАМ. В частности, на диаграмме 500 проиллюстрирован количественный показатель гидроксирования K117, измеренный с использованием двух протоколов расщепления и двух приборов LC/MS, в трех экземплярах для каждого. Итерации 1-3 и 7-9 МАМ относятся к протоколу 1 расщепления, а циклы анализа 4-6 и 10-12 относятся к протоколу 2 расщепления. Итерации 1-6 МАМ выполняли на приборе Thermo Q Exactive™ BioPharma Platform, а итерации 7-12 МАМ выполняли на приборе Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ Mass Spectrometer. На диаграмме 500 показано, что изменчивость между приборами значений количественных показателей (например, A_i) по всем итерациям 1-12 МАМ при использовании процедур (404) нового калиброванного МАМ значительно уменьшилась по сравнению с изменчивостью значений количественных показателей по итерациям 1-12 МАМ с использованием процедур (402) традиционного МАМ. Иными словами, согласованность значений количественных показателей (например, A_i) между приборами по каждой итерации 1-12 МАМ при использовании процедур (404) нового калиброванного МАМ значительно улучшается по сравнению с изменчивостью значений количественных показателей по каждой итерации 1-12 МАМ с использованием процедур (402) традиционного МАМ. Таким образом, на фигуре 5а проиллюстрированы измеренные значения количественных показателей гидроксирования K117 для двух разных моделей приборов. Посредством процедуры (402) традиционного МАМ разные вариации количественных показателей были получены на двух разных приборах с поддержкой МАМ. Однако процедуры (404) нового калиброванного МАМ обеспечили согласующиеся значения количественных показателей на двух разных приборах с поддержкой МАМ.

[00114] На фигуре 5b представлена диаграмма, изображающая уменьшение отклонений между приборами/между лабораториями по 57 атрибутам качества согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе. Гидроксирование K117, представленное на фигуре 5а, является одним из 57 атрибутов качества, представленных на фигуре 5b. На оси y 560у диаграммы 550 показано RSD внутрилабораторной прецизионности в процентных долях. На оси x 560х диаграммы 550 показаны 57 атрибутов качества, среди которых одним таким атрибутом качества является гидроксирование K117. Каждый из 57 атрибутов качества определяли с использованием процедуры (402) традиционного МАМ и процедуры (404) нового калиброванного МАМ. Диаграмма 550 на фигуре 5b показывает, что в то время как RSD атрибутов качества при использовании процедуры (402) традиционного МАМ в целом было в диапазоне 3-50%, RSD атрибутов качества при использовании процедур (404) нового калиброванного МАМ было уменьшено до менее 20% для большинства атрибутов качества, показывая таким

образом уменьшение изменчивости посредством калибровок интенсивности сигналов в ходе работы согласно различным вариантам осуществления, раскрытым в данном документе.

[00115] В данном документе описано, что уменьшение изменчивости прибора (приборов) с поддержкой МАМ посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы обеспечивает преимущества для масс-спектрометрии (как, например, описано для фигуры 2). Например, калибрование коэффициентов отклика (например, a_i), как это описано в данном документе, устраняет требование необходимости одинакового коэффициента отклика у разных пептидных изоформ (k). Данная методика может быть применена и к другим типам инструментальных средств для целей МАМ. Например, что касается традиционных методологий, то мониторинг выбранной реакции (SRM) на трехквadrupольном приборе не подходит для целей МАМ из-за потенциально разных показателей эффективности фрагментации среди пептидных изоформ. Однако процедура нового калиброванного МАМ, описанная в данном документе, дает возможность выполнять МАМ на трехквadrupольном приборе, что может быть более предпочтительным, чем использование прибора с орбитальной ловушкой, благодаря лучшей точности, линейности и динамическому диапазону трехквadrupольного прибора. Однако в таких вариантах осуществления может потребоваться изначальная установка на приборе с высокой точностью концентрации каждого атрибута в референтном стандарте.

[00116] Хотя в раскрытии данного документа излагается подробное описание многих разных вариантов осуществления, следует понимать, что правовые рамки описания определяются терминами формулы изобретения, изложенной в конце данного патента, и эквивалентами. Подробное описание следует интерпретировать как приведенное только в качестве примера, и оно не описывает каждый возможный вариант осуществления, поскольку описание каждого возможного варианта осуществления было бы непрактичным. Могут быть реализованы многочисленные альтернативные варианты осуществления с использованием современной технологии или технологии, разработанной после даты подачи этого патента, которые все равно попадают в объем формулы изобретения.

[00117] Следующие дополнительные рассуждения применимы к представленному ранее обсуждению. По всему данному описанию во множественных примерах могут быть реализованы компоненты, технологические операции или структуры, описанные в единственном экземпляре. Хотя отдельные операции в одном или нескольких способах проиллюстрированы и описаны как отдельные операции, одна или несколько индивидуальных операций могут быть выполнены одновременно и отсутствует требование о том, чтобы операции выполнялись в представленном порядке. Структуры и функциональные возможности, представленные как отдельные компоненты в иллюстративных конфигурациях, могут быть реализованы как комбинированная структура или компонент. Аналогично структуры и функциональные возможности, представленные как единый компонент, могут быть реализованы как отдельные

компоненты. Эти и другие варианты, модификации, добавления и усовершенствования попадают в объем изложенного в данном документе объекта изобретения.

[00118] Дополнительно определенные варианты осуществления описаны в данном документе как содержащие логические элементы или ряд процедур, подпроцедур, приложений или команд. Они могут составлять или программное обеспечение (например, код, реализованный на машиночитаемом носителе или в сигнале передачи) или аппаратное обеспечение. В аппаратном обеспечении процедуры и т. п. представляют собой конкретные блоки, которые могут выполнять определенные операции и могут быть приспособлены или расположены в определенном порядке. В иллюстративных вариантах осуществления одна или несколько компьютерных систем (например, автономная, клиентская или серверная компьютерная система) или один или несколько аппаратных модулей компьютерной системы (например, процессор или группа процессоров) могут быть приспособлены посредством программного обеспечения (например, приложения или части приложения) как модуль аппаратного обеспечения, который работает для выполнения определенных операций, как это описано в данном документе.

[00119] Различные операции иллюстративных способов, описанных в данном документе, могут быть выполнены по меньшей мере частично одним или несколько процессорами, которые временно приспособлены (например, посредством программного обеспечения) или постоянно приспособлены для выполнения соответствующих операций. Будучи приспособлены временно или постоянно, такие процессоры могут составлять реализованные процессорами модули, которые функционируют для выполнения одной или нескольких операций или функций. Модули, на которые ссылаются в данном документе, могут в некоторых иллюстративных вариантах осуществления предусматривать реализованные процессорами модули.

[00120] Аналогично способы или процедуры, описанные в данном документе, могут быть по меньшей мере частично реализованы процессорами. Например, по меньшей мере некоторые из операций способа могут быть выполнены одним или несколькими процессорами или модулями программного обеспечения, реализованными процессорами. Выполнение определенных операций может быть распределено среди одного или нескольких процессоров, находящихся не только в одной машине, но размещенных в целом ряде машин. В некоторых примерных вариантах осуществления процессор или процессоры могут быть расположены в одном местоположении, тогда как в других вариантах осуществления процессоры могут быть распределены в целом ряде местоположений.

[00121] Выполнение определенных операций может быть распределено среди одного или нескольких процессоров, находящихся не только в одной машине, но размещенных в целом ряде машин. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления один или несколько процессоров или реализованных процессорами модулей могут быть расположены в одном географическом местоположении (например, в домашней среде, офисной среде или серверном парке). В других вариантах осуществления

один или несколько процессоров или реализованных процессорами модулей могут быть распределены в целом ряде географических местоположений.

[00122] Данное подробное описание необходимо интерпретировать только как приведенное в качестве примера, и оно не описывает каждый возможный вариант осуществления, поскольку описание каждого возможного варианта осуществления было бы непрактичным, если не невозможным. Специалист в данной области техники может реализовать множество альтернативных вариантов осуществления с использованием либо современной технологии, либо технологии, разработанной после даты подачи настоящей заявки.

[00123] Специалисты в данной области техники поймут, что многочисленный ряд модификаций, изменений и комбинаций может быть выполнен применительно к описанным выше вариантам осуществления без отхода от объема настоящего изобретения и что такие модификации, изменения и комбинации необходимо рассматривать как попадающие в объем идеи настоящего изобретения.

[00124] Формула изобретения в конце данной патентной заявки не предназначена для ограничения согласно § 112(f) 35 свода законов США, если только традиционный язык описания средств и функций не процитирован явно, например выражения «средство для» или «стадия для» отчетливо процитированы в пункте (пунктах) формулы изобретения. Системы и способы, описанные в данном документе, направлены на усовершенствование компьютерных функциональных возможностей и усовершенствуют функционирование стандартных компьютеров.

[00125] Аспекты

[00126] Следующие аспекты настоящего изобретения являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

[00127] 1. Система калибровки, приспособленная для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (МAM) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом система калибровки содержит первый прибор с поддержкой МAM, содержащий первый детектор, при этом первый прибор с поддержкой МAM характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек, при этом первый прибор с поддержкой МAM приспособлен для приема первого образца и референтного стандарта, и первый прибор на основе МAM дополнительно приспособлен для обнаружения посредством первого детектора изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте; один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МAM, при этом один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МAM, приспособлены для определения посредством первой итерации МAM первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе (изоформам) первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте, и при этом один или несколько процессоров,

связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе (изоформам) первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов; второй прибор на основе МАМ, содержащий второй детектор, при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек, при этом состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора, при этом второй прибор с поддержкой МАМ приспособлен для приема второго образца и референтного стандарта, и второй прибор с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен для обнаружения посредством второго детектора изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте; и один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте, и при этом один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и при этом значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

[00128] 2. Система калибровки согласно аспекту 1, где один или несколько процессоров, связанных с первым прибором для MS, посредством первой итерации МАМ определяют атрибут качества.

[00129] 3. Система калибровки согласно аспекту 2, где атрибут качества представляет собой любое из изоформы первого образца, белка или идентифицированной примеси.

[00130] 4. Система калибровки согласно любому из аспекта 2 или аспекта 3, где атрибут качества определяется каким-либо одним или несколькими из фрагментации, окисления, гликирования, гидроксирования, вариантов последовательности, изомеризации, дезаминирования, С-концевого лизина, О-связанных гликанов и/или N-связанных гликанов.

[00131] 5. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где один или несколько процессоров, связанных с первым прибором для MS, приспособлены для генерации отчета, содержащего атрибут качества.

[00132] 6. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где

модель первого прибора отличается от модели второго прибора.

[00133] 7. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где первый набор настроек отличается от второго набора настроек.

[00134] 8. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где первый набор поправочных коэффициентов основан на значении интенсивности ионов первой изоформы референтного стандарта и первом значении количественного показателя в референтном стандарте первой изоформы референтного стандарта.

[00135] 9. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где первый набор поправочных коэффициентов обеспечивает калибровку коэффициента отклика, связанного с первым набором значений количественных показателей в образце, с определением значений интенсивности ионов изоформы первого образца.

[00136] 10. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где первый набор значений количественных показателей в образце дополнительно основан на значении интенсивности ионов изоформы первого образца.

[00137] 11. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где первый прибор с поддержкой МАМ представляет собой прибор для масс-спектрометрии (MS).

[00138] 12. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где первый прибор с поддержкой МАМ представляет собой трехквadrupольный прибор.

[00139] 13. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где один или несколько процессоров, связанных с первым прибором для MS, соединены с возможностью осуществления связи по компьютерной сети с одним или несколькими процессорами, связанными со вторым прибором для MS.

[00140] 14. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, представляют собой один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ.

[00141] 15. Система калибровки согласно любому из предыдущих аспектов, где первый прибор с поддержкой МАМ расположен в первой лаборатории в первом географическом местоположении, а второй прибор с поддержкой МАМ расположен во второй лаборатории во втором географическом местоположении.

[00142] 16. Способ калибровки для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (ММ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом способ калибровки предусматривает прием в первом приборе с поддержкой ММ, содержащем первый детектор, первого образца и референтного стандарта; обнаружение посредством первого детектора изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой ММ, в течение первой итерации ММ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего

изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов, и при этом первый прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из: (1) первой модели прибора или (2) первого набора настроек; прием во втором приборе с поддержкой МАМ, содержащем второй детектор, второго образца и референтного стандарта; обнаружение посредством второго детектора изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, в течение второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек, где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора, и где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

[00143] 17. Способ калибровки для уменьшения изменчивости прибора с поддержкой МАМ в течение нескольких периодов времени посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом данный способ калибровки предусматривает прием в приборе с поддержкой МАМ в течение первого периода времени первого образца и референтного стандарта; обнаружение посредством детектора прибора с поддержкой МАМ в течение первого периода времени изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров в течение первой итерации МАМ в течение первого периода времени первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров посредством первой итерации МАМ в течение первого периода времени первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений

количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов, и где прибор с поддержкой МАМ в течение первого периода времени характеризуется состоянием первого прибора, определенным первым набором настроек; прием в приборе с поддержкой МАМ в течение второго периода времени второго образца и референтного стандарта; обнаружение посредством детектора прибора с поддержкой МАМ в течение второго периода времени изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров в течение второй итерации МАМ в течение второго периода времени второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте; и определение посредством одного или нескольких процессоров посредством второй итерации МАМ в течение второго периода времени второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и где прибор с поддержкой МАМ в течение второго периода времени характеризуется состоянием второго прибора, определенным вторым набором настроек, где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора, и где значение вариации первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

[00144] 18. Система калибровки согласно аспекту 17, где один или несколько процессоров определяют атрибут качества.

[00145] 19. Система калибровки согласно аспекту 18, где атрибут качества представляет собой любое из изоформы первого образца, изоформы второго образца, белка или идентифицированной примеси.

[00146] 20. Система калибровки согласно любому из аспектов 17-19, где один или несколько процессоров приспособлены для генерации отчета, содержащего атрибут качества.

[00147] 21. Система калибровки согласно аспекту 1, где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается на по меньшей мере 25 процентов.

[00148] 22. Способ калибровки согласно аспекту 16, где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается на по меньшей мере 25 процентов.

[00149] 23. Способ калибровки согласно аспекту 17, где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается на по меньшей мере 25

процентов.

[00150] 24. Система калибровки согласно аспекту 1, где первый образец представляет собой протеолитический пептид, второй образец протеолитического пептида, и референтный стандарт представляет собой протеолитический пептид.

[00151] 25. Способ калибровки согласно аспекту 16, где первый образец представляет собой протеолитический пептид, второй образец протеолитического пептида, и референтный стандарт представляет собой протеолитический пептид.

[00152] 26. Способ калибровки согласно аспекту 17, где первый образец представляет собой протеолитический пептид, второй образец протеолитического пептида, и референтный стандарт представляет собой протеолитический пептид.

[00153] Дополнительное описание

[00154] Как описано в данном документе, новые системы и способы калибровки предоставлены для определения количественного показателя каждого атрибута с использованием известного количественного показателя каждого атрибута в референтном стандарте в качестве калибранта. Большинство атрибутов качества в референтном стандарте остаются постоянными в течение всего периода времени до деградации стандарта и поэтому могут служить калибрantom для корректировки отличий между приборами или процедурами подготовки образцов. Поскольку данные по референтному стандарту обычно получают посредством типичного способа МАМ с целью идентификации и определения пригодности системы, какой-либо дополнительной работы химика-аналитика не требуется. Благодаря этой методологии более не требуется согласовывать модели приборов. В то же время незначительные изменения в процедуре расщепления от лаборатории к лаборатории, а также изменения, обусловленные автоматизацией, не будут оказывать существенного влияния на результат исследования.

[00155] Классификация атрибутов

[00156] В зависимости от того, может ли количественный показатель атрибута изменяться в ходе подготовки образцов, для целей МАМ каждый атрибут относят к одному из трех типов, включая атрибуты 1 типа, атрибуты 2 типа и атрибуты 3 типа.

[00157] Атрибуты 1 типа не изменяются в ходе подготовки образца. Примеры включают варианты последовательности, гидроксилирование лизина и пролина и т. д. Основную часть гликозилирования можно отнести к данной группе, когда образцы не подвергаются воздействию чрезвычайно низкого pH в ходе подготовки образца.

[00158] Количественные показатели атрибутов 2 типа могут уменьшаться в ходе подготовки образца. Примеры включают фосфорилирование вследствие нестабильности данной модификации. Поскольку реакционные (например, потери фосфорилирования) субстраты для атрибутов 2 типа обычно являются второстепенными компонентами (например, фосфорилированный пептид), абсолютное изменение атрибутов 2 типа в ходе подготовки образца является незначительным. Особым атрибутом 2 типа является остаточный N-концевой глутамин. Когда N-конец белка представлен остатком глутамина, он обычно циклизуется с образованием пироглутаминовой кислоты в качестве

основного компонента. N-концевой глутамин, который является второстепенным компонентом, в данной работе рассматривают как модифицированную форму пироглутаминовой кислоты. N-концевой глутамин является атрибутом 2 типа, поскольку циклизация может произойти в ходе подготовки образца с уменьшением количественного показателя свободного N-концевого глутамина.

[00159] Относительное содержание атрибутов 3 типа может увеличиваться в ходе подготовки образца. Атрибуты 3 типа включают окисление, дезаминирование, изомеризацию аспарагиновой кислоты, фрагментацию и т. д. Поскольку реакционный субстраты для атрибутов 3 типа представляют собой основные немодифицированные пептиды, их абсолютное изменение в ходе подготовки образца может быть достаточно высоким.

[00160] Как будет обсуждаться далее, атрибуты 1 типа и 2 типа часто можно измерить с высокой точностью и низким пределом количественного определения, поскольку различие результатов обусловлено исключительно и в основном LC-MS-измерениями. Атрибуты 3 типа, с другой стороны, характеризуются более низкой точностью и более высоким пределом количественного определения, поскольку различия в подготовке образца вносят вклад в различие окончательных результатов.

[00161] Обозначения

[00162] Обозначения, используемые в данном документе, можно вкратце изложить следующим образом: A представляет количественный показатель изоформы в качестве дробной величины (или процентной доли). I представляет измеренную интенсивность ионов (площадь под пиком в хроматограмме в режиме селективного детектирования ионов) изоформы. k представляет коэффициент отклика, а a представляет поправочный коэффициент для коэффициента отклика. Верхний индекс 0 представляет собой референтный стандарт (RS). Например, A^0 представляет известный количественный показатель изоформы в RS и I^0 представляет измеренную ионную интенсивность изоформы в RS. Нижние индексы 0, 1, 2, ..., i , ..., n представляют $n+1$ изоформу, которые связаны с заданным остатком (включая немодифицированную форму). Нижний индекс 0 представляет наиболее распространенную изоформу (обычно немодифицированную форму). Например, A_i представляет количественный показатель изоформы i , I_i представляет интенсивность ионов изоформы i , k_i представляет коэффициент отклика изоформы i , а a_i представляет поправочный коэффициент для коэффициента отклика для изоформы i . Значение a_0 задано равным 1. Нижний индекс 1 может быть опущен в определенных уравнениях, когда имеется лишь одна изоформа, отличная от основной изоформы ($n=1$). Следует отметить, что в случаях упоминания в данном отчете изоформ $i=0, 1, \dots, n$, они обычно связаны с единственным остатком, независимо от того, указано это явно или нет. Например, могут быть представлены три изоформы, связанные с остатком Asn в пептиде, включая немодифицированную Asn, ее дезамидированную форму и ее сукцинимидированную форму. Окисленный остаток Met на том же пептиде, однако, может относиться к другому набору изоформ (предполагая, например, что данные две

модификации являются случайными и поэтому независимы друг от друга).

[00163] Традиционный МАМ

[00164] В традиционном способе МАМ количественный показатель каждого атрибута (например, разные состояния модификации аминокислотного остатка в пептиде) вычисляют на основе откликов MS (например, площади под пиком в хроматограмме в режиме селективного детектирования ионов) модифицированного пептида и немодифицированного пептида со следующими стандартными допущениями:

1. В каждом образце все изоформы, связанные с аминокислотным остатком, имеют одинаковый коэффициент отклика (соотношения всех коэффициентов отклика=1)

2. Искусственно вносимые изменения характеристики являются незначительными

[00165] Допуская, что аминокислотный остаток имеет $n+1$ состояний модификации (0, 1, ..., n), имеется $n+1$ пептидных изоформ, связанных с представляющим интерес остатком. Наиболее распространенную изоформу, обычно немодифицированную, обозначают как $i=0$. Количественный показатель каждой изоформы вычисляют на основе следующего уравнения (3):

$$\begin{cases} kA_i = I_i, i = 0, n \\ \sum_{j=0}^n A_j = 1 \end{cases} \quad (3)$$

[00166] В указанном выше уравнении (3) k представляет коэффициент отклика для всех изоформ пептида (например, постоянная величина на основе указанного выше допущения 1), а A_i и I_i представляют количественный показатель и MS-интенсивность изоформы i соответственно. Коэффициент отклика k представляет комбинацию как извлечения пептида, так и MS-отклика каждой изоформы.

[00167] Решение уравнения (3) дает уравнение (4):

$$\begin{cases} k = \sum_{j=0}^n I_j \\ A_i = \frac{I_i}{\sum_{j=0}^n I_j} \end{cases} \quad (4)$$

[00168] Уравнение (4) утверждает, что количественный показатель каждой изоформы вычисляется путем деления MS-интенсивности изоформы на сумму значений MS-интенсивности всех изоформ.

[00169] Благодаря допущениям, описанным выше, традиционный способ МАМ должен удовлетворять следующим требованиям:

1. Эффективность расщепления должна быть воспроизводимой.
2. Состояния приборов для MS должны быть одинаковыми.
3. Подготовка образца должно вносить минимальное количество искусственных модификаций.

[00170] Однако в реальности указанные выше требования удовлетворить сложно,

по меньшей мере из-за следующих причин:

1. Степень извлечения пептида может изменяться вследствие различий в процедуре подготовки образца, навыках химиков-аналитиков, качестве устройств и реагентов и т. д.

2. Из-за различий в модели прибора для MS, установках прибора и характера технического обслуживания прибора коэффициенты отклика для разных пептидных изоформ могут отличаться.

3. Величина искусственно вносимой модификации может различаться вследствие различий в процедуре подготовки образца, навыках химиков-аналитиков, качестве устройств и реагентов, а также состоянии приборов.

[00171] Из-за указанных выше трудностей, обусловленных требованиями традиционного МАМ, необходима новая методология для преодоления этих недостатков, чтобы гарантировать долговременный успех МАМ.

[00172] Калибрование коэффициентов отклика с использованием референтного стандарта

[00173] В МАМ референтный стандарт, как правило, анализируют параллельно с образцами с целью проверки пригодности системы или подлинности. Поскольку большинство атрибутов качества в референтном стандарте остаются постоянными в течение всего срока использования стандарта, референтный стандарт может служить калибрантом для корректировки различия между приборами или процедурами подготовки образца. Количественный показатель каждого атрибута в референтном стандарте может быть установлен или с использованием традиционного МАМ, или ортогонального метода с лучшей точностью. Если количественный показатель атрибута в референтном стандарте определяют аналитическим методом с абсолютным количественным определением, все последующие анализы МАМ того же атрибута также становятся абсолютным измерением после калибровки коэффициента отклика.

[00174] При использовании референтного стандарта в качестве калибранта в каждом цикле анализа большинство требований к традиционному МАМ в плане воспроизводимости между лабораториями и между приборами можно устранить. Тогда в таких вариантах осуществления традиционные два допущения, описанные в данном документе выше, принимают следующий вид, т. е. исправленные допущения:

1. В пределах одной и той же последовательности LC-MS соотношения коэффициентов отклика среди всех изоформ остаются постоянными.

2. Искусственно вносимые изменения атрибутов являются незначительными.

[00175] Следует отметить, что в первом исправленном допущении вместо требования того, чтобы все пептидные изоформы имели одинаковый коэффициент отклика (соотношения всех коэффициентов отклика=1) в течение срока использования продукта, оно лишь требует, чтобы соотношения коэффициентов отклика были постоянными в пределах одной и той же последовательности LC-MS (у одного химика-аналитика, для одного прибора и в течение одного дня).

[00176] При новых исправленных допущениях отменяется допущение, что каждая

изоформа имеет одинаковый коэффициент отклика. Вместо этого допускают, что коэффициенты отклика для изоформы i модифицируются одинаковым поправочным коэффициентом a_i и в референтном стандарте, и в образце. Поэтому коэффициент отклика для изоформы i в референтном стандарте выражают в виде $a_i k^0$ (где верхний индекс 0 обозначает референтный стандарт), а коэффициент отклика для изоформы i в образце обозначают как $a_i k$. В результате анализа как референтного стандарта, так и образца, уравнение (3) превращается в уравнение (5), которое является таким же, как и уравнение (2), описанное в данном документе:

$$\begin{cases} a_i k^0 A_i^0 = I_i^0, i = 0, n \\ a_i k A_i = I_i, i = 0, n \\ a_0 = 1 \\ \sum_{j=0}^n A_j = 1 \end{cases} \quad (5)$$

[00177] В некоторых вариантах осуществления коэффициент отклика для референтного стандарта и образца может отличаться вследствие небольшого отличия в подготовке образца, отличия в чувствительности инструментов и т. д. Кроме того, для того, чтобы уравнения были разрешимыми, коэффициент a для одной из изоформ обычно приводят к постоянному значению. Не имеет значения, какую изоформу приводят к константе a . Является целесообразным приведение к константе наиболее распространенной изоформы, которой обычно является немодифицированная форма ($a_0=1$).

[00178] Решение уравнения (5) дает уравнение (6), которое является таким же, как и уравнение (1), описанное в данном документе:

$$\begin{cases} a_i = \frac{I_i^0}{I_0^0} \frac{A_0^0}{A_i^0}, i = 0, n \\ A_i = \frac{I_i / a_i}{\sum_{j=0}^n \frac{I_j}{a_j}}, i = 0, n \end{cases} \quad (6)$$

[00179] Уравнение (6) может быть использовано для вычисления поправочного коэффициента для каждой изоформы (a_i) с учетом известного количественного показателя атрибута для референтного стандарта (A_i^0) и вычисления количественного показателя каждой изоформы в образце (A_i). Для того, чтобы параметры a_i имели однозначно определенные значения, знаменатели не должны быть близкими к нулю. Поэтому для успешной калибровки коэффициента отклика каждый атрибут, для того, чтобы его можно было точно количественно определить, в референтном стандарте должен иметь достаточно высокий количественный показатель (A_i^0).

[00180] Калибровка искусственных модификаций с использованием

референтного стандарта

[00181] Некоторые атрибуты, включая атрибуты 2 типа, такие как фосфорилирование, и атрибуты 3 типа, такие как окисление, дезамидирование, изомеризация остатков аспарагиновой кислоты и фрагментация, могут изменять собственный количественный показатель в ходе подготовки образца или по причине потери модификации из-за их нестабильности (2 тип), или из-за искусственного образования данных модификаций (3 тип). Данные искусственные изменения атрибутов приводят к изменчивости между результатами между химиками-аналитиками и между днями и могут быть скорректированы с использованием референтного стандарта в качестве калибранта, допуская, что степень данных искусственных изменений является согласующейся в одной и той же последовательности LC-MS.

[00182] В вариантах осуществления, где коэффициент b_i используется для обозначения степени искусственного изменения для каждой изоформы, после анализа как референтного стандарта, так и образца, уравнение (3) превращается в уравнение (7):

$$\begin{cases} k^0[A_i^0 + b_i S_i^0] = I_i^0, i = 0, n \\ k[A_i + b_i S_i] = I_i, i = 0, n \\ \sum_{j=0}^n A_j = 1 \end{cases} \quad (7)$$

[00183] В уравнении (7) S_i представляет субстрат для искусственной модификации, которая дает изоформу i . Например, для окисления и дезамидирования (атрибута 3 типа), субстратом является немодифицированный пептид. Для фосфорилирования (атрибута 2 типа), однако, субстратом является модифицированный (фосфорилированный) пептид вследствие возможной нестабильности модификации.

[00184] В зависимости от природы субстрата уравнение (7) может становиться сложным. Например, использование уравнения (7) для множества модификаций по одному и тому же остатку, например N-гликозилирования по остаткам аспарагина, может привести к сложному варианту уравнения (7).

[00185] Для остатков с единственной модификацией уравнение (7) может быть сокращено до уравнения (8) и/или уравнения (9), как описано в данном документе, в зависимости от того, является ли субстрат модифицированным пептидом (2 тип) или немодифицированным пептидом (3 тип). Как показано в вариантах осуществления ниже, для уравнений (8) и (9) части уравнения справа являются решениями частей уравнения слева.

[00186] В частности, для атрибутов 2 типа и применительно к уравнению (8):

$$\begin{cases} k^0(1 - A^0 - bA^0) = I_0^0 \\ k^0(A^0 + bA^0) = I^0 \\ k(1 - A - bA) = I_0 \\ k(A + bA) = I \end{cases} \rightarrow \begin{cases} b = \frac{I^0}{A^0(I_0^0 + I^0)} - 1 \\ A = \frac{I}{(1+b)(I_0 + I)} \end{cases} \rightarrow \quad (8)$$

$$A = \frac{I(I_0^0 + I^0)}{(I_0 + I)I^0} A^0$$

[00187] Для атрибутов 3 типа и применительно к уравнению (9):

$$\begin{cases} k^0[1 - A^0 - b(1 - A^0)] = I_0^0 \\ k^0[A^0 + b(1 - A^0)] = I^0 \\ k[1 - A - b(1 - A)] = I_0 \\ k[A + b(1 - A)] = I \end{cases} \rightarrow \begin{cases} b = \frac{\frac{I^0}{I_0^0 + I^0} - A^0}{1 - A^0} \\ A = \frac{\frac{I}{I_0 + I} - b}{1 - b} \end{cases} \quad (9)$$

[00188] В уравнении (8), если объем искусственной модификации значительно меньше, чем немодифицированная форма (т. е. $b \ll 1$), что обычно является верным для большинства атрибутов 2 типа, уравнение (8) можно рассматривать как уравнение (10):

$$\begin{cases} k^0(1 - A^0) = I_0^0 \\ (1 + b)k^0 A^0 = I^0 \\ k(1 - A) = I_0 \\ (1 + b)kA = I \end{cases} \quad (10)$$

[00189] Уравнение (10) подобно уравнению (5), когда $a_1 = 1 + b$. То есть в таких вариантах осуществления потеря модификации в ходе расщепления может быть смоделирована посредством калибровки коэффициента отклика, и уравнения (8) и (5) будут давать очень похожий результат.

[00190] Для того, чтобы параметр b и количественный показатель атрибута A имели однозначно определенные значения, знаменатели не должны быть близкими к нулю. Поэтому, чтобы использовать уравнение (8), количественный показатель атрибута в референтном стандарте (A^0) должен намного превышать 0. Чтобы использовать уравнение (9), A^0 должно быть намного меньше 1 (100%) и b не должно быть близким к 1. Кроме того, чтобы уравнение (9) в целом было действительным, значение b должно быть намного меньше, чем количественный показатель атрибута без калибровки ($b \ll I/(I_0 + I)$). Иначе калиброванный количественный показатель A будет близким к нулю и иногда отрицательной величиной.

[00191] Калибровка как коэффициентов отклика, так и искусственных модификаций с использованием двух разных стандартов

[00192] Референтный стандарт может быть использован для корректировки любого из коэффициента отклика (a) (т. е. «а-калибровка») и/или искусственной модификации (b) (т. е. «b-калибровка»). Дополнительный стандарт необходим для корректировки каждого из a и b . Для получения другого стандарта референтный стандарт или другой образец могут быть подвергнуты стрессовому воздействию, чтобы создать другой стандарт, содержащий более высокий уровень представляющих интерес атрибутов, а затем оба стандарта анализируют вместе с образцами. Известное количественный показатель атрибутов для двух стандартов и их определенные MS-отклики могут быть использованы

для корректировки каждого из а и b.

[00193] Верхний индекс, равный нулю, может быть использован для представления референтного стандарта, а верхний индекс, равный 1, может быть использован для представления подвергнутого стрессовому воздействию стандарта, при рассмотрении обоих стандартов и образца. Уравнения (11) и (12) иллюстрируют характерные уравнения в зависимости от субстрата для искусственной модификации. Следует обратить внимание, что уравнения (11) и (12) относятся к остаткам с единственной модификацией.

[00194] Для атрибутов 2 типа и применительно к уравнению (11):

$$\left\{ \begin{array}{l} k^0[1 - A^0 - bA^0] = I_0^0 \\ ak^0[A^0 + bA^0] = I^0 \\ k^1[1 - A^1 - bA^1] = I_0^1 \\ ak^1[A^1 + bA^1] = I^1 \\ k[1 - A - bA] = I_0 \\ ak[A + bA] = I \end{array} \right. \rightarrow \left\{ \begin{array}{l} a = \frac{I^0 I^1 (A^1 - A^0)}{I_0^0 I^1 A^0 - I^0 I_0^1 A^1} \\ b = \frac{I^0}{A^0 (aI_0^0 + I^0)} - 1 \\ A = \frac{I(aI_0^0 + I^0)}{I^0 (aI_0 + I)} A^0 \end{array} \right. \quad (11)$$

[00195] Для атрибутов 3 типа и применительно к уравнению (12):

$$\left\{ \begin{array}{l} k^0[1 - A^0 - b(1 - A^0)] = I_0^0 \\ ak^0[A^0 + b(1 - A^0)] = I^0 \\ k^1[1 - A^1 - b(1 - A^1)] = I_0^1 \\ ak^1[A^1 + b(1 - A^1)] = I^1 \\ k[1 - A - b(1 - A)] = I_0 \\ ak[A + b(1 - A)] = I \end{array} \right. \rightarrow \left\{ \begin{array}{l} a = \frac{I_0^0 I^1 (1 - A^1) - I^0 I_0^1 (1 - A^0)}{I_0^0 I_0^1 (A^1 - A^0)} \\ b = \frac{1}{1 - A^0} \left(\frac{I^0}{aI_0^0 + I^0} - A^0 \right) \\ A = \frac{1}{1 - b} \left(\frac{I}{aI_0 + I} - b \right) \end{array} \right. \quad (12)$$

[00196] Как показано выше для уравнений (11) и/или (12), для того чтобы параметры а и b имели однозначно определенные значения, знаменатель не должен быть близким к нулю. Поэтому уравнение (11) требует $I_0^0 I^1 A^0 \gg I_0^1 I^0 A^1$, а уравнение (12) требует $A^1 \gg A^0$ и $A^0 \ll 1$. Подобно уравнению (9), чтобы уравнение (12) имело смысл, значение b должно быть намного меньше, чем количественный показатель атрибута без b-калибровки ($b \ll I/(aI_0 + I)$), иначе калиброванный количественный показатель А будет равным нулю и иногда отрицательной величиной.

[00197] Пример многопараметрического анализа антитела класса IgG2 к стрептавидину

[00198] Как описано в данном документе, различные иллюстративные варианты осуществления были реализованы на практике посредством конкретных вариантов применения систем и способов калибровки по настоящему изобретению. Однако необходимо понимать, что системы и способы калибровки по настоящему изобретению не ограничены конкретными вариантами применения. Например, рекомбинантный IgG2 к стрептавидину был экспрессирован в клеточной линии яичника китайского хомячка (CHO). Материал, представляющий собой IgG2 к стрептавидину, использовали в качестве референтного стандарта. Для получения тестовых образцов для анализа референтный стандарт инкубировали при примерно 40°C в течение приблизительно 30 дней, чтобы получить образец 1, а затем образцы 2 и 3 получали путем смешивания образца 1 с референтным стандартом в разных соотношениях (см. таблицу 2).

[00199] Референтный стандарт IgG2 и тестовые образцы (по ~120 мкг каждого) расщепляли трипсином с использованием следующей процедуры. Сначала каждый образец обрабатывали 8 мМ дитиотреитола при примерно 25°C в течение приблизительно 30 минут в условиях денатурирующего раствора, содержащего 6,5 М гидрохлорид гуанидина (Macron Fine Chemicals, Страудсбург, Пенсильвания) и 0,2 М трис (TEKnova, Холлистер, Калифорния) при pH 7,5 для восстановления дисульфидных связей. Затем восстановленный IgG2 алкилировали посредством 14 мМ иодуксусной кислоты при примерно 25° в течение примерно 20 минут в отсутствии света. Реакцию алкилирования гасили с использованием 6 мМ DTT.

[00200] С целью преднамеренного создания определенных различий в процедуре подготовки образца каждый восстановленный/алкилированный образец расщепляли трипсином с использованием двух разным методик. Согласно первой методике восстановленный/алкилированный образец (концентрация IgG2 ~1,2 мг/мл) заменяли буфером для расщепления, содержащим примерно 0,1 М трис и примерно 50 мМ метионина (pH 7,5) с использованием колонки Bio-Spin® 6 компании Bio-Rad (Геркулес, Калифорния), например, в соответствии с рекомендованной процедурой производителя. После замены буфера соответствующее количество трипсина добавляли для достижения соотношения фермент:субстрат примерно 1:12, после чего инкубировали при примерно 37°C в течение приблизительно 60 минут. Расщепление гасили с использованием равного объема примерно 0,25 М ацетатного буфера (pH 4,8) в 8 М гидрохлорида гуанидина. Конечная концентрация IgG2 в продукте расщепления составляла ~0,5 мг/мл.

[00201] Согласно второй методике каждый восстановленный/алкилированный образец подвергали обработке с заменой на такой же буфер для расщепления с использованием фильтра Microcon-30 кДа (Millipore Sigma, Берлингтон, Массачусетс). Сначала каждый восстановленный/алкилированный образец центрифугировали при примерно 14000 g и фильтрат отбрасывали. В определенных вариантах осуществления процесс повторяли еще три раза после добавления в фильтр каждый раз 250 мкл буфера для расщепления. Расщепление трипсином проводили на том же фильтре путем добавления 140 мкл буфера для расщепления и 10 мкг трипсина (при 1 мг/мл), после чего

выполняли инкубацию при примерно 37°C в течение приблизительно 60 минут. После расщепления равный объем горящего раствора добавляли в фильтр и центрифугировали при приблизительно 14000 g для сбора пептидов в новой приемной пробирке. Конечная концентрация IgG2 в продукте расщепления согласно указанной выше процедуре составляет ~0,4 мг/мл.

[00202] В таблице 2 показаны образцы IgG2 к стрептавидину, использованные в примерах.

ТАБЛИЦА 2

<i>Название образца</i>	<i>Описание</i>
Референтный стандарт	IgG2 к стрептавидину (30 мг/мл)
Образец 1	IgG2 к стрептавидину, подвергнутый стрессовому воздействию при 40°C в течение 30 дней (также используется как 2 ^{-ой} стандарт для калибровки как а, так и b)
Образец 2	10% образца 1+90% референтного стандарта
Образец 3	20% образца 1+80% референтного стандарта

[00203] В IgG2 к стрептавидину и/или подобных вариантах осуществления каждый продукт расщепления анализировали посредством каждой из трех систем для LC-MS/MS, состоящих из системы для HPLC от Agilent (Санта-Клара, Калифорний), соединенной с масс-спектрометром, например, Thermo Scientific Q Exactive Plus Biopharma или масс-спектрометром Orbitrap Fusion Lumos. Также использовали дополнительные или альтернативные системы, поскольку описание в данном документе не ограничено никаким типом системы, масс-спектрометра или иначе. В некоторых вариантах осуществления, чтобы намеренно привнести определенную разницу в условия жидкостной хроматографии, использовали две разных методики LC (см. таблицу 3).

[00204] Для первой методики LC (например, системы А и В в таблице 3) пептиды подвергали элюированию в колонке Acquity peptide CSH (150 × 2,1 мм, размер частиц 1,7 мкм, размер пор 170 Å) от Waters (Милфорд, Массачусетс) со скоростью потока приблизительно 0,3 мл/мин с поддержанием температуры колонки при примерно 60°C. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% муравьиную кислоту в воде, а подвижная фаза В представляла 0,1% муравьиную кислоту в ацетонитриле. После исходного удерживания при примерно 0,5% В в течение приблизительно 5 минут количество подвижной фазы В обычно линейно наращивают до примерно 35% в течение приблизительно 40 минут. Промывку колонки осуществляли посредством увеличения количества подвижной фазы В до примерно 99% в течение приблизительно 4 минут с удерживанием в течение приблизительно 1 минуты. Колонку уравнивали с использованием примерно 0,5% В в течение приблизительно 15 минут. Для второй

методики LC (например, система С в таблице 3), пептиды подвергали элюированию в колонке Waters Acquity BEH C18 ($2,1 \times 150$ мм, размер частиц 1,7 мкм) со скоростью потока примерно 0,3 мл/мин с поддержанием температуры колонки на уровне приблизительно 60°C. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% муравьиную кислоту и приблизительно 0,02% трифторуксусную кислоту (TFA) в воде, а подвижная фаза В представляла собой 0,1% муравьиную кислоту и 0,02% TFA в ацетонитриле. После исходного удержания при примерно 0,5% В в течение приблизительно 5 минут количество фазы В обычно линейно наращивают до приблизительно 40% в течение приблизительно 40 минут. Промывку колонки осуществляли посредством увеличения количества фазы В до примерно 99% в течение приблизительно 4 минут с удержанием в течение приблизительно 1 минуты. Колонку уравнивали с использованием примерно 0,5% В в течение приблизительно 15 минут.

[00205] Системы для HPLC были прямо подключены к масс-спектрометру, например, любому из масс-спектрометра Thermo Scientific Q Exactive Plus Biopharm (например, система А) или масс-спектрометра Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos (например, системы В и С), посредством интерфейса с электроспреем. Хотя в вариантах осуществления данного документа описаны масс-спектрометр Thermo Scientific Q Exactive Plus Biopharm и/или масс-спектрометр Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos, необходимо понимать, что в соответствии с вариантами осуществления, раскрытыми в данном документе, могут быть использованы аналогичные масс-спектрометр(ы). Q Exactive Plus Biopharm был настроен для выполнения MS в режиме полного сканирования с разрешением приблизительно 70000 и $AGC=1 \times 10^6$, после которого следовали пять зависимых MS/MS-сканирований (диссоциация, активируемая соударениями при повышенной энергии (HCD), нормализованная энергия соударений=27) для большинства распространенных ионов. В случае Fusion Lumos данные, полученные при выполнении MS в режиме полного сканирования, собирали с разрешением приблизительно 60000 и $AGC=4 \times 10^5$, после чего следовали высокоскоростные зависимые MS/MS-сканирования в ионной ловушке (нормализованная энергия соударений CID=30). Управление приборами и сбор данных выполняли посредством аналитического программного обеспечения, например, программного обеспечения Thermo Scientific Xcalibur. Приблизительно от 3 до 4 мкг каждого продукта триптического расщепления вводили для анализа. Разумеется, согласно вариантам осуществления, раскрытым в данном документе, можно использовать программное обеспечение, аналогичное программному обеспечению Xcalibur.

[00206] Данные, полученные посредством LC-MS/MS, обрабатывали посредством аналитического программного обеспечения, MassAnalyzer, которое поставляется Thermo Scientific под названием BiopharmaFinder™). Аналитическое программное обеспечение, как, например, MassAnalyzer, способно выполнять извлечение характеристик, выравнивание времени удерживания, идентификацию пептидов и количественное определение атрибута в полностью автоматизированном режиме. Для идентификации

пептидов аналитическое программное обеспечение, например MassAnalyzer, может полагаться на сравнение экспериментальных данных MS/MS с точно с прогнозированными теоретическими данными MS/MS. Подогнанную окнообразную функцию использовали для извлечения хроматограммы в режиме селективного детектирования ионов, чтобы максимизировать соотношение сигнала и шума в хроматограмме. В качестве окончательного результата аналитическое программное обеспечение, например MassAnalyzer, может создавать список идентифицированных вариантов. Необходимо понимать, что согласно вариантам осуществления, раскрытым в данном документе, может быть использовано аналитическое программное обеспечение, аналогичное MassAnalyzer.

[00207] Пример многопараметрического анализа слитого белка

[00208] Рекомбинантный слитый белок (например, первый белок, или фрагмент белка, рекомбинантно слитый с по меньшей мере вторым белком или его фрагментом, часто посредством линкеров, соединяющих белки/фрагменты), экспрессированный в клетках CHO, может содержать множество сайтов гликозилирования, таких как остатки треонина и серина. Данные О-гликаны могут приносить наибольший вклад в гетерогенность молекулы. В этом примере многопараметрический способ использовали для количественного определения данных гликоформ в слитом белке.

[00209] Для протеолитического расщепления слитый белок сначала подвергали денатурации в растворе, содержащем примерно 7,5 М гуанидина HCl, приблизительно 250 мМ трис (pH 7,5) и приблизительно 2 мМ EDTA, при концентрации белка примерно 1 мг/мл. Перед протеолитическим расщеплением примерно 2 мкл 500 мМ раствора DTT добавляли к примерно 100 мкл раствора денатурированного белка, после чего его инкубировали при примерно 25°C в течение приблизительно 30 минут для восстановления дисульфидных связей. Затем добавляли примерно 4 мкл 500 мМ йодацетата натрия, после чего инкубировали при приблизительно 25°C в течение приблизительно 20 минут для алкилирования боковых цепей цистеина. После процедуры замены буфера на раствор 100 мМ трис, 50 мМ метионина, pH 7,5 посредством обессоливающей колонки Bio-Rad Bio-Spin, каждые 50 мкг обессоленного образца расщепляли с использованием примерно 5 мкг трипсина при примерно 37°C в течение приблизительно 30 минут. Для погашения расщепления приблизительно 2% муравьиной кислоты добавляли к каждому продукту расщепления для достижения конечной концентрации кислоты примерно 0,2%.

[00210] Каждый продукт триптического расщепления (~3 мкг) анализировали с использованием системы для LC-MS, состоящей из Agilent HPLC, прямо подключенного к масс-спектрометру, например, масс-спектрометру Thermo Scientific Exactive plus или Q Exactive plus high-resolution (см. таблицу 3). Пептиды подвергали элюированию в колонке Agilent Zorbax C18 RR HD (2,1 × 150 мм, размер частиц 1,8 мкм, размер пор 300 Å) со скоростью потока примерно 0,2 мл/мин с поддержанием температуры колонки на уровне 50°C. Подвижная фаза А представляла собой примерно 0,1% муравьиную кислоту в воде, а подвижная фаза В представляла собой 0,1% муравьиную кислоту в ацетонитриле.

Начиная с примерно 1,0%, подвижную фазу В линейно повышали до примерно 40% после приблизительно 70 минут и до примерно 90% к моменту времени приблизительно 76 минут. После промывки при приблизительно 90% в течение примерно 5 минут колонку уравнивали с использованием примерно 1% В в течение приблизительно 11 минут. Данные, полученные при выполнении MS в режиме полного сканирования, собирали с разрешением 140000, а автоматический контроль заполнения ловушки (AGC) устанавливали как 1×10 . Управление приборами и сбор данных выполняли, например, посредством программного обеспечения Thermo Scientific Chromeleon.

[00211] Данные анализировали, например, посредством программного обеспечения Thermo Scientific Pinpoint и Chromeleon для идентификации и относительного количественного определения посттрансляционных модификаций. Перечень О-гликопептидов характеризовали посредством MS/MS с использованием HCD и диссоциации с переносом электронов (ETD), при этом обычно обнаруживают шесть гликоформ. Pinpoint может генерировать рабочий журнал с точными распределениями масс и изотопов для шести форм О-гликопептидов. Рабочий журнал импортировали в программное обеспечение Chromeleon, где ионы-предшественники MS1 анализировались по времени удерживания, точной массе, а также распределению изотопов. Хроматограмму в режиме селективного детектирования ионов генерировали в Chromeleon, и каждый пик интегрировали для площади пика. Интеграцию каждого пика подтверждали вручную, чтобы гарантировать точность.

[00212] В таблице 3 представлены иллюстративные системы для LC-MS и описанные измерения.

ТАБЛИЦА 3

<i>Систем</i> <i>a</i>	MS	HPLC	<i>Колонка для</i> HPLC	<i>Методика* HPLC</i>
IgG2 к стрептавидину				
A	Q Exactive Plus Biopharma	Agilent 1290	Waters peptide CSH при 60°C	Добавка: 0,1% муравьиная кислота Градиент: от 0,5% до 35% AcN за 40 мин Скорость потока: 0,3 мл/мин
B	Fusion Lumos	Agilent 1290	Waters peptide CSH при 60°C	Добавка: 0,1% муравьиная кислота Градиент: от 0,5% до 35% AcN за 40 мин Скорость потока: 0,3 мл/мин

C	Fusion	Agilent	Waters	БЕН	Добавка: 0,1% муравьиная кислота+0,02% TFA
	Lumos	1200	C18 при 60°C		Градиент: от 0,5% до 40% AcN за 40 мин Скорость потока: 0,3 мл/мин
Белок, слитый с Fc					
D	Q Exactive Plus	Agilent 1290	Agilent Zorbax RR	C18 HD	Добавка: 0,1% муравьиная кислота Градиент: от 1% до 40% AcN за 70 мин Скорость потока: 0,2 мл/мин
	Biopharma		(2,1×150 мм, размер частиц 1,8 мкм, 300 Å)		
E	Exactive Plus (блок 1)	Agilent 1290			
F	Exactive Plus (блок 2)	Agilent 1290			

[00213] Пример калибровки отклика

[00214] Калибровку отклика выполняли с использованием аналитического программного обеспечения, такого как Excel® от Microsoft® (Редмонд, Вашингтон), приспособленного для реализации одного или нескольких уравнений, описанных в данном документе. Данные, относящиеся к антителам к стрептавидину, обрабатывали посредством аналитического программного обеспечения, например, MassAnalyzer. Поскольку MassAnalyzer прямо выдает некалиброванный количественный показатель каждого атрибута и данные некалиброванные количественные показатели пропорциональны соответствующим MS-интенсивностям (площадям пика), их рассматривали как MS-интенсивности в соответствующих расчетах. Данные о белке, слитом с Fc, обрабатывали с использованием программы Thermo Scientific Chromeleon, в которой площадь пика каждой характеристики определяли и использовали как интенсивности MS для соответствующих расчетов. Стандартной практикой является то, что образец референтного стандарта анализируют по меньшей мере дважды (чтобы охватывать образцы). Для выражения практической эффективности в расчетах использовали среднюю MS-интенсивность для двух циклов анализа с эталонным стандартом.

[00215] Пример измерения большого количества атрибутов в IgG2 к стрептавидину

[00216] В данном примере была продемонстрирована комплексная оценка работы систем и способов калибровки, которые раскрыты в данном документе. Референтный

стандарт, представляющий собой IgG2 к стрептавидину, инкубировали при приблизительно 40°C в течение примерно четырех недель. Затем примерно 10% и примерно 20% данного подвергнутого стрессовому воздействию образца добавляли в референтный стандарт, соответственно для создания двух или нескольких тестовых образцов (см., например, таблицу 2). Такие тестовые образцы вместе как с референтным стандартом, так и с подвергнутым стрессовому воздействию образцом, расщепляли трипсином в трех экземплярах с использованием двух разных протоколов, при этом каждый продукт расщепления посредством трех разных систем LC-MS (см., например, А, В и С, показанные в таблице 3) с разными колонками, подвижными фазами, градиентами и масс-спектрометрами. Кроме того, каждый из референтного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию образца анализировали посредством системы А шесть раз и средний измеренный количественный показатель каждого атрибута использовали в качестве референтного количественного показателя. Все данные обрабатывали посредством аналитического программного обеспечения, например MassAnalyzer, с получением некалиброванного количественного показателя для каждой изоформы пептида. Эти количественные показатели использовали как значения MS-интенсивности для последующей калибровки.

[00217] Поскольку системы А и В используют одинаковое хроматографическое состояние, данные из этих циклов (например, в общей сложности 60 циклов анализа LC-MS/MS) обрабатывают вместе, поскольку они имеют согласующиеся показатели времени удерживания. Например, в общем 177 атрибутов качества идентифицировали и количественно определили как превышающие предел обнаружения (например, на что указывает отличная от нуля площадь пика во всех 60 циклах анализа). Такие атрибуты охватывают широкий спектр уровней количественного показателя, включая от 0,001% до 39%. Такие атрибуты включали варианты последовательности, гидроксилирование, N-связанные и O-связанные гликаны, N-концевые и C-концевые варианты, фрагментацию, гликирование, окисление, дезамидирование, образование сукцинимидов и т. д. Фрагментации отличали от неспецифической активности трипсина по их повышенному уровню в подвергнутом стрессовому воздействию образце (например, р-значение t-теста <0,005 и кратность изменения >2,0 по сравнению с циклами анализа референтного стандарта).

[00218] Пример калибровки коэффициентов отклика (а-калибровка)

[00219] С использованием референтного стандарта для калибровки коэффициента отклика (см. уравнения (5) и (6)) были рассчитаны значения количественного показателя для каждого из 177 атрибутов в трех образцах. Фигура 6 представляет собой диаграмму 602 измеренных количественных показателей для двух атрибутов во образце 2 посредством двух разных установок приборов и двух разных процедур подготовки образца. После калибровки коэффициента отклика, как это описано в данном документе, вариации, вызванные различиями в подготовке образца и установке инструмента, значительно уменьшаются, на что указывает относительное стандартное отклонение

(RSD) 12 измерений, представленных на фигуре 6 (т. е., A/1, A/2, B/1 и B/2). В частности, вариант осуществления, изображенный на фигуре 6, представляет количественный показатель в образце 2, с калибровкой коэффициента отклика и без нее, варианта последовательности тяжелой цепи Cys127Tyr (вверху) (604) и негликозилированного Asn289 (внизу) (606), измеренный посредством двух систем для LC-MS (например, A и B) и с использованием двух протоколов расщепления (/1 и /2). После калибровки коэффициента отклика (см. уравнения (6)) отличия между приборами и процедурами подготовки образцов значительно уменьшаются, на что указывают значениями RSD 605 и 607.

[00220] Фигура 7 представляет собой диаграмму 702, на которой изображено иллюстративное сравнение внутрилабораторной прецизионности (например, указанной посредством RSD) с (704) калибровкой коэффициента отклика и без нее (706) (см. уравнение (6)) для трех типов атрибутов. На фигуре 7 показано, что внутрилабораторная прецизионность значительно улучшается после калибровки по примерно 86% отслеживаемым атрибутам. Форма значений, представленных на фигуре 7, представляет тип атрибутов, и значения, обозначенные не закрашенными фигурами, представляют атрибуты с достаточно высоким количественным показателем в референтном стандарте (в пределах последовательности $RSD < 10\%$).

[00221] В частности, на фигуре 7 показано определенное RSD (по 12 измерениям с двумя протоколами расщепления и двумя установками приборов, как показано на фигуре 6) всех 177 атрибутов (120 атрибутов 1 типа, 12-2 типа и 45-3 типа) в трех образцах, с (704) калибровкой коэффициента отклика и без (706) нее. На фигуре 7 представлено в общем $177 \times 3 = 531$ точка данных, каждая с 12 измерениями. RSD большинства (457 или 86%) точек данных уменьшается после калибровки коэффициента отклика. Из 531 точек данных количество точек с $RSD < 10\%$ возросло с 64 (12%) перед калибровкой до 205 (39%) после калибровки. Среди них в варианте осуществления на фигуре 7 число атрибутов 1 типа возросло с 55 до 171, атрибутов 2 типа - с 2 до 36, и атрибутов 3 типа - с 7 до 19. Среди этих 205 точек данных с приемлемой внутрилабораторной прецизионностью ($RSD < 10\%$) 83% (171 из 205) относятся к атрибутам 1 типа.

[00222] Как уже обсуждалось, калибровка коэффициента отклика требует, чтобы количественный показатель атрибута в референтном стандарте был в целом достаточно высоким, чтобы его количество можно было точно определить. На фигуре 7 атрибуты с количественным показателем, превышающим 10-кратное стандартное отклонение (в пределах последовательности $RSD < 10\%$), обозначены значениями, обозначенными не закрашенными фигурами. Например, по меньшей мере в варианте осуществления на фигуре 7 большинство атрибутов с RSD ниже 10% после калибровки, характеризуются высоким количественным показателем в референтном стандарте (т. е. значения, обозначенные не закрашенными фигурами).

[00223] Пример калибровки искусственных модификаций (b-калибровка)

[00224] Для вариантов осуществления, относящихся к атрибутам 2 типа и 3 типа,

отличия в искусственных модификациях в разных условиях подготовки образца могут быть откалиброваны с использованием уравнения (8) для атрибутов 2 типа и уравнения (9) для атрибутов 3 типа.

[00225] На фигуре 8 представлена диаграмма 802 варианта осуществления калибровки искусственной модификации для атрибутов 2 типа, демонстрирующая схожие результаты, как и для а-калибровки коэффициента отклика. В частности, на фигуре 8 представлено улучшение внутрилабораторной прецизионности для атрибутов 2 типа (например, для двух атрибутов в трех образцах получили шесть измерений (806)) после калибровки, которое сравнивали по RSD (804) после калибровки коэффициента отклика. В соответствии с вариантами осуществления, описанными в данном документе, два способа калибровки дали очень похожие RSD.

[00226] На фигуре 9 представлена диаграмма 902 результатов b-калибровки искусственной модификации для атрибутов 3 типа в сравнении с а-калибровкой коэффициента отклика. На фигуре 9 представлено, что применительно к атрибутам 3 типа калибровка (904) искусственных модификаций улучшила внутрилабораторную прецизионность по большинству измерений. Для атрибутов с параметром b калибровки, близким к некалиброванному количественному показателю характеристики $I/(I_0+I)$, калиброванный количественный показатель A (см. уравнение (9)) может быть близким к нулю, поэтому он может существенно влиять на значения RSD. Для корректного сравнения разных способов калибровки RSD вычисляли путем деления стандартного отклонения калиброванного количественного показателя на среднее значение а-калиброванного количественного показателя атрибута. В сравнении с калибровкой коэффициента отклика (а-калибровкой), калибровка искусственной модификации (b-калибровка) дала аналогичные результаты, когда RSD некалиброванных количественных показателей (906) меньше 50%. Если RSD некалиброванного количественного показателя выше 50%, результаты b-калибровки могут становиться менее эффективными по сравнению с а-калибровкой, и если RSD некалиброванного количественного показателя близко к 100%, калибровка искусственных модификаций делает результат менее согласующимся (например, более высокое RSD).

[00227] Пример калибровки как коэффициентов отклика (а), так и искусственных модификаций (b)

[00228] В некоторых вариантах осуществления как коэффициент отклика, так и искусственную модификацию можно калибровать для атрибутов 3 типа, когда второй стандарт легко получить посредством стрессового воздействия на референтный стандарт. На фигуре 10 представлена диаграмма 1002 варианта осуществления, показывающая результаты калибровки по двум стандартам (а и b) для атрибутов 3 типа, по сравнению с калибровкой коэффициента отклика по одному стандарту (а). В частности, на фигуре 10 показаны результаты калибровки (1004) по сравнению с отсутствием калибровки (1006) при использовании референтного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию образца (образца 1) в качестве двух стандартов и образцов 2 и 3 в качестве образцов для

анализа. RSD вычисляли путем деления стандартного отклонения калиброванного количественного показателя на средний а-калиброванный количественный показатель атрибута. Фигура 10 демонстрирует, что результаты калибровки по двум стандартам в целом лучше, чем калибровка коэффициента отклика по одному стандарту, но размер улучшения может быть незначительным, и в таких обстоятельствах, но не во всех, может не оправдывать хранение второго референтного стандарта в течение срока использования данного продукта.

[00229] Иллюстративная калибровка коэффициента отклика с данными, сгенерированными в абсолютно разных системах для LC-MS

[00230] На фигуре 11 представлена диаграмма 1102, показывающая усовершенствование, внесенное в согласованность двух наборов данных, полученных при использовании двух разных систем для LC-MS, посредством калибровки коэффициента отклика. В частности, на фигуре 11 представлена иллюстрация сравнения количественных показателей характеристик, определенных посредством системы А (1104) и системы С (1106), с (1114) калибровкой коэффициента отклика и без (1116) нее. На фигуре 11 также представлено сравнение показателей внутрилабораторной прецизионности (RSD) обоих наборов данных с калибровкой и без нее. Как представлено на фигуре 11, значения, обозначенные незакрашенными фигурами, представляют атрибуты с количественным показателем, который в по меньшей мере десять раз больше стандартного отклонения в референтном стандарте (например, в пределах последовательности $RSD < 10\%$).

[00231] Иными словами, на фигуре 11 представлены результаты калибровки коэффициента отклика на основе анализа данных LC-MS, где данные LC-MS собраны с использованием двух разных методик LC и двух разных систем для MS (систем А (1104) и С (1106)), где подготовку образца выполняют посредством двух разных процедур. В варианте осуществления, представленном на фигуре 11, определенные значения количественных показателей атрибутов сравнивали друг с другом с (1114) калибровкой коэффициента отклика и без (1116) нее.

[00232] Анализ образцов с использованием другой методики может обнаружить и идентифицировать другой набор атрибутов, как это показано на фигуре 11, среди которых 117 являются общими. На фигуре 11 измерение 117 атрибутов в трех образцах дало 351 точку данных и соответствующие определенные количественные показатели, полученные посредством двух методик, с а-калибровкой и без нее. Такие значения представлены на фигуре 11 (верхний график) (1103). На фигуре 11 показано, что калибровка значительно улучшила согласованность измерений, даже если две системы для LC-MS были абсолютно разными. Фигура 11 (нижний график) (1113) демонстрирует улучшение внутрилабораторной прецизионности после калибровки коэффициента отклика для данных 117 атрибутов. Многие из данных атрибутов могут быть точно измерены посредством одних и тех же прибора и методики (указаны значениями, обозначенными незакрашенными фигурами).

[00233] Однако когда такие атрибуты измеряли посредством другой системы,

результаты не были согласующимися, о чем свидетельствуют высокие значения RSD, - от 10% до 100% на горизонтальной оси (некалиброванные). Большинство этих измерений стали снова согласованными после калибровки, о чем свидетельствуют их значения RSD на вертикальной оси, которые меньше 10%.

[00234] Иллюстративный гликановый профиль а-слитого белка

[00235] В данном примере слитой белок содержит два сайта О-связанного гликозилирования с шестью разными гликоформами. Образец с неизвестным количественным показателем гликоформы, вместе с референтным стандартом, анализировали в четырех циклах трое химиков-аналитиков на трех системах для LC-MS (см. таблицу 3). Все данные обрабатывали на Chromeleon, чтобы получать площади пиков, соответствующие каждому представляющему интерес пептиду. Количественный показатель каждой гликоформы количественно определяли с использованием традиционного способа (уравнение (4)), а также калибровки коэффициента отклика (уравнение (6)). Для определения количественного показателя каждого атрибута в референтном стандарте референтный стандарт анализировали посредством традиционного МАМ шесть раз, и среднее значение шести измерений использовали в качестве известного количественного показателя в референтном стандарте.

[00236] На фигуре 12 представлена диаграмма 1202, на которой показано измеренный количественный показатель (1204) гликоформы (SAHexHexNAc) в четырех последовательностях (1206), в трех экземплярах каждая. После калибровки коэффициента отклика (уравнение (6)) вариация между приборами значительно уменьшилось. На фигуре 12 (нижний график) также показано, что калибровка коэффициента отклика для шести гликоформ (1216) уменьшила RSD (1214) от максимум 21% до максимум 5% (SA: сиаловая кислота или N-ацетилнейраминовая кислота; Hex: гексоза; HexNAc: N-ацетилгексозамин). В частности, на фигуре 12 (верхний график) (1203) показаны 12 измеренных количественных показателей (анализ в трех повторах в 4 последовательностях 1206) для одной из гликоформ с калибровкой коэффициента отклика и без нее. Хотя измеренные количественные показатели были в высокой степени воспроизводимыми в одной и той же последовательности, такие измеренные количественные показатели значительно варьировали от последовательности к последовательности. Калибровка коэффициента отклика устранила различие, обусловленное приборами. На фигуре 12 (нижний график) (1213) сравнивается внутрилабораторное RSD для всех шести гликоформ без калибровки и с ней. RSD для этих гликоформ составило от 2,4% до 21% без калибровки. После калибровки оно сократилось до не более 5%.

[00237] Калибровка

[00238] В некоторых, но не во всех, вариантах осуществления вычисление количественных показателей атрибутов с использованием способов калибровки может потребовать дополнительного измерения интенсивностей ионов каждой изоформы в референтном стандарте. Эти дополнительные измерения могут вносить дополнительные

погрешности в конечный расчет количественного показателя атрибута. Улучшение внутрилабораторной прецизионности может быть достигнуто в том случае, если погрешности, вызванные этими дополнительными измерениями, меньше, чем различие между лабораторией и пробормом.

[00239] В некоторых, но не во всех, вариантах осуществления для обеспечения улучшения прецизионности измерений после калибровки необходимо определить интенсивность ионов каждой изоформы в референтном стандарте. Для этого требуется, чтобы представляющий интерес атрибут содержался в достаточно высоком количестве в референтном стандарте. Как правило, количественный показатель атрибута должен в по меньшей мере десять раз превышать стандартное отклонение измерения (показано, например, в виде значений, обозначенных незакрашенными фигурами, на фигурах 7, 8, 9 и 10, описанных в данном документе).

[00240] Для вариантов осуществления, включающих b-калибровку 3 типа (уравнение (9)), вычисление количественного показателя A атрибута может включать взятие разницы между некалиброванным количественным показателем $I/(I_0+I)$ атрибута и b. Если значение b близко к $I/(I_0+I)$, то вычисление A включает взятие разницы двух больших чисел с получением очень маленького числа, что потенциально может давать большие погрешности. В крайних случаях значение b может быть больше, чем $I/(I_0+I)$, в результате чего получают отрицательное значение A. Это может сделать b-калибровку для атрибутов 3 типа менее надежной. То же является верным и для a- и b-калибровки для атрибутов 3 типа, показанной в уравнении (12).

[00241] В некоторых вариантах осуществления различие в коэффициентах отклика, которые включают как эффективность расщепления, так и отклик прибора, может представлять особую важность, поскольку применение инструментальных средств для HPLC и MS, а также автоматизация подготовки образца, являются неизбежными. Искусственные модификации, как правило, можно контролировать (как описано в данном документе), и они представляют собой меньшую проблему. Поэтому при сравнении трех способов калибровки калибровка коэффициента отклика (a-калибровка) обычно является наиболее предпочтительной из-за ее надежности и применимости к атрибутам всех трех типов. Калибровка искусственной модификации (b-калибровка) по атрибутам 3 типа, хотя и может корректировать обусловленные подготовкой образца несоответствия, не корректируемые a-калибровкой, обычно является менее надежной, если уровень коррекции близок к количественному показателю атрибута. В некоторых вариантах осуществления b-калибровка по атрибуту 2 типа, из-за сходства в математических аспектах, дает те же результаты, что и a-калибровка, поэтому она может быть заменена a-калибровкой. Калибровка по двум стандартам как для коэффициента отклика, так и для искусственной модификации (a- и b-калибровка), с другой стороны, в некоторых, но не во всех, вариантах осуществления может быть менее практичной из-за необходимости дополнительного стандарта в течение срока использования продукта. Кроме того, еще два измерения интенсивности ионов могут быть необходимы при a- и b-калибровке, что

дополнительно увеличивает вариацию окончательного результата количественного показателя атрибута. Поэтому калибровка коэффициента отклика с использованием единственного стандарта обычно используется для реализации новых систем и способов МАМ, как это описано в данном документе, в условиях текущих правил GMP.

[00242] Новые системы и способы МАМ обладают значительными преимуществами над традиционным МАМ, поскольку новые системы и способы МАМ существенно уменьшают изменчивость между лабораториями посредством калибровки откликов в ходе работы. Новые системы и способы МАМ фактически устраняют требование к МАМ по использованию единого оборудования, что является основной проблемой в существующем рабочем цикле МАМ. Кроме того, поскольку референтный стандарт обычно уже должен быть проанализирован параллельно с образцом в текущем рабочем цикле, не требуется какая-либо дополнительная работа химика-аналитика.

[00243] Как описано в данном документе, использование уравнения (6) для калибровки коэффициентов отклика устраняет требование того, чтобы разные изоформы пептидов имели одинаковый коэффициент отклика. Поэтому новые системы и способы МАМ могут быть использованы для других типов инструментальных средств для МАМ. Например, из-за требования эквивалентности коэффициентов отклика для разных изоформ в традиционном МАМ мониторинг выбранной реакции (SRM) на трехквadrupольном приборе является неприемлемым из-за потенциально сильно отличающейся эффективности фрагментации среди пептидных изоформ. Новые системы и способы МАМ, с другой стороны, дают возможность использовать преимущество трехквadrupольных приборов, поскольку такие новые системы и способы МАМ не требуют, чтобы разные изоформы пептидов обладали эквивалентными коэффициентами отклика. Количественный показатель каждого атрибута в референтном стандарте, однако, должен быть исходно установлен на приборе высокого разрешения.

[00244] Одним недостатком такой традиционной методологии МАМ является то, что измеренный количественный показатель атрибута не является абсолютным, вследствие допущения, что все изоформы имеют одинаковые коэффициенты отклика, что может быть неверным в случае модификаций, которые включают изменения заряда, гидрофобности или длины пептида. Этот недостаток обычно не представляет особой проблемы до тех пор, пока коэффициенты отклика являются согласующимися в ходе всего срока использования способа. Однако, если количественный показатель атрибута в референтном стандарте определяют посредством методики с абсолютным количественным определением, то количественный показатель атрибута, определенный в соответствии с новой методологией МАМ, также становится абсолютным значением.

[00245] Данные, показанные для различных вариантов осуществления в данном документе, также могут быть использованы для получения понимания о пределе количественного определения (LOQ) платформы МАМ. LOQ может быть определен как минимальная концентрация атрибута с RSD менее 10%. Например, на фигуре 13 представлена диаграмма 1302, на которой показана взаимосвязь количественного

показателя атрибута (1306 и/или 1316) и RSD в пределах последовательности (1304 и/или 1314) для трех типов атрибутов. В варианте осуществления, представленном на фигуре 13, для атрибутов 1 типа (верхняя диаграмма) (1303) RSD (1304) для большинства атрибутов составляет менее 10% при количественных показателях (1306), не превышающих 0,003% (LOQ=0,003%), если пика минорной второстепенной изоформы хорошо отделяется от других пиков, соответствующих главным пептидам. Если имеет место неудовлетворительное отделение пика изоформы от главного пика, LOQ будет выше вследствие ограниченного динамического диапазона масс-спектрометров, используемых в данной работе, в пределах сканирования. Однако для атрибутов 2 типа и 3 типа (нижняя диаграмма) (1313) большинство атрибутов ниже 0,1% характеризуются RSD (1314) >10%, а большинство атрибутов выше 1% характеризуются RSD (1314) < 10%, предполагая, что значения LOQ, как правило, находятся между ~0,1% и ~1% в зависимости от величины различий, вносимых в ходе подготовки образца.

[00246] В частности, на фигуре 13 показана взаимосвязь количественного показателя (1306 и/или 1316) и RSD в пределах последовательности (n=6) (1304 и/или 1314) для разных типов атрибутов. Для большинства атрибутов 1 типа на фигуре 13 (верхняя диаграмма) (1303) значения RSD в пределах последовательности находятся ниже 10%, при снижении количественного показателя до 0,003%, указывая на то, что предел количественного определения системы для LC-MS достигает лишь 0,003%, если атрибут не подвергается изменению в ходе подготовки образца. Как также показано на фигуре 13 (нижняя диаграмма) (1313), пределы количественного определения являются гораздо более высокими (0,1-1%) для большинства атрибутов 2 типа и 3 типа.

[00247] Дополнительные аспекты

[00248] Следующие дополнительные аспекты настоящего изобретения являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Следующие дополнительные аспекты можно рассматривать как часть или дополнение аспектов настоящего изобретения, или отдельно от них, включая в качестве неограничивающего примера любые из аспектов 1-26, описанные в данном документе.

[00249] 27. Система калибровки, приспособленная для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (ММ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом система калибровки содержит первый прибор с поддержкой ММ, содержащий первый детектор, при этом первый прибор с поддержкой ММ характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек, при этом первый прибор с поддержкой ММ приспособлен для приема первого образца и референтного стандарта, и первый прибор с поддержкой ММ дополнительно приспособлен для обнаружения посредством первого детектора первой изоформы образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте, где первый образец получен подготовлен посредством первого типа подготовки; один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с

поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте, и один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов; второй прибор с поддержкой МАМ, содержащий второй детектор, при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек, где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора, при этом второй прибор с поддержкой МАМ приспособлен для приема второго образца и референтного стандарта, и второй прибор с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен посредством второго детектора для обнаружения изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте, где второй образец подготовлен посредством второго типа подготовки, и где первый тип подготовки отличается от второго типа подготовки образцов, что приводит к вариации между первым образцом и вторым образцом, при этом вариация вызвана искусственным изменением количественного показателя атрибута в ходе подготовки образцов; и один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте, и один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и при этом значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов, где по меньшей мере один из (1) одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, посредством первой итерации МАМ или (2) одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором на основе МАМ, посредством второй итерации МАМ определяет атрибут качества с уменьшением вариации между первым образцом и вторым образцом, при этом атрибут качества связан с атрибутом 2 типа или атрибутом 3 типа.

[00250] 28. Система калибровки согласно аспекту 27, где атрибут 2 типа

обуславливает уменьшение количественного показателя в ходе подготовки первого образца или второго образца.

[00251] 29. Система калибровки согласно аспекту 27, где атрибут 3 типа обуславливает увеличение количественного показателя в ходе подготовки первого образца или второго образца.

[00252] 30. Способ калибровки для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (МАМ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом способ калибровки предусматривает прием в первом приборе с поддержкой МАМ первого образца и референтного стандарта, при этом первый прибор с поддержкой МАМ содержит первый детектор, и первый прибор с поддержкой МАМ характеризуется первым состоянием прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) первой модели прибора или (2) первого набора настроек; обнаружение первым детектором первого основанного на МАМ прибора первой изоформы образца из первого образца и первой изоформы референтного стандарта из референтного стандарта, где первый образец подготовлен посредством первого типа подготовки; определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, посредством первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов; прием посредством второго прибора с поддержкой МАМ второго образца и референтного стандарта, при этом второй прибор с поддержкой МАМ содержит второй детектор, при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из: (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек, где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора; обнаружение посредством второго детектора второго прибора с поддержкой МАМ изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте, где второй образец подготовлен посредством второго типа подготовки, и где первый тип подготовки отличается от второго типа подготовки образцов, что приводит к вариации между первым образцом и вторым образцом, при этом вариация вызвана искусственным изменением количественного показателя атрибута в ходе подготовки образцов; определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, посредством второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте; и определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с

поддержкой МАМ, второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов, и где по меньшей мере один из (1) одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, посредством первой итерации МАМ или (2) одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором на основе МАМ, посредством второй итерации МАМ определяет атрибут качества с уменьшением вариации между первым образцом и вторым образцом, при этом атрибут качества связан с атрибутом 2 типа или атрибутом 3 типа.

[00253] 31. Способ калибровки согласно аспекту 30, где атрибут 2 типа обуславливает уменьшение количественного показателя в ходе подготовки первого образца или второго образца.

[00254] 32. Способ калибровки согласно аспекту 30, где атрибут 3 типа обуславливает увеличение количественного показателя в ходе подготовки первого образца или второго образца.

[00255] 33. Система калибровки, приспособленная для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (МАМ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом система калибровки содержит первый прибор с поддержкой МАМ, содержащий первый детектор, при этом первый прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек, при этом первый прибор с поддержкой МАМ приспособлен для приема первого образца, референтного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию стандарта, и при этом первый прибор с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен посредством первого детектора для обнаружения первой изоформы образца в первом образце, первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте и изоформы подвергнутого стрессовому воздействию референтного стандарта в подвергнутом стрессовому воздействию стандарте; один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных с первым основанным прибором с поддержкой МАМ, приспособлены посредством первой итерации МАМ для определения первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте и подвергнутом стрессовому воздействию стандарте, и один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в

образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов; второй прибор с поддержкой МАМ, содержащий второй детектор, при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется вторым состоянием прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек, при этом состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора, при этом второй прибор с поддержкой МАМ приспособлен для приема второго образца, референтного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию стандарта, и второй прибор с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен посредством второго детектора для обнаружения изоформы второго образца во втором образце, второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте и второй изоформы подвергнутого стрессовому воздействию стандарта в подвергнутом стрессовому воздействию стандарте; и один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены посредством второй итерации МАМ для определения второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте и подвергнутом стрессовому воздействию стандарте, и при этом один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и при этом значение вариации первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

[00256] 34. Система калибровки согласно аспекту 33, где подвергнутый стрессовому воздействию стандарт содержит более высокий уровень атрибутов качества по сравнению с референтным стандартом.

[00257] 35. Способ калибровки для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (ММ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом способ калибровки предусматривает прием в первом приборе с поддержкой ММ первого образца, референтного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию стандарта, при этом первый прибор с поддержкой ММ содержит первый детектор, и первый прибор с поддержкой ММ характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек; обнаружение посредством первого детектора прибора с поддержкой ММ изоформы первого образца в первом образце, первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте и изоформы подвергнутого стрессовому воздействию референтного стандарта в подвергнутом стрессовому воздействию стандарте; определение

посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, посредством первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на эталонном стандарте и подвергнутом стрессовому воздействию стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов; прием во втором приборе с поддержкой МАМ второго образца, референтного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию стандарта, при этом второй прибор с поддержкой МАМ содержит второй детектор, при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется вторым состоянием прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) второй модели прибора или (2) второго набора настроек, при этом состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора; обнаружение посредством второго детектора второго прибора с поддержкой МАМ изоформы второго образца во втором образце, второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте и второй изоформы подвергнутого стрессовому воздействию стандарта в подвергнутом стрессовому воздействию стандарте; определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, посредством второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на эталонном стандарте и подвергнутом стрессовому воздействию стандарта; и определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, при этом значение вариации первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

[00258] 36. Способ калибровки согласно аспекту 35, где подвергнутый стрессовому воздействию стандарт содержит более высокий уровень атрибутов качества по сравнению с референтным стандартом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система калибровки, приспособленная для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (МАМ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом система калибровки содержит:

первый прибор с поддержкой МАМ, содержащий первый детектор, при этом первый прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек, при этом первый прибор с поддержкой МАМ приспособлен для приема первого образца и референтного стандарта, и первый прибор с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен для обнаружения посредством первого детектора изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте;

один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте, и один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов;

второй прибор с поддержкой МАМ, содержащий второй детектор, при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек,

где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора,

при этом второй прибор с поддержкой МАМ приспособлен для приема второго образца и референтного стандарта, и второй прибор с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен для обнаружения посредством второго детектора изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте; и

один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте, и один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго

образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и

где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

2. Система калибровки по п. 1, где один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, посредством первой итерации МАМ определяют атрибут качества.

3. Система калибровки по п. 2, где атрибут качества представляет собой любое из изоформы первого образца, белка или идентифицированной примеси.

4. Система калибровки по п. 2, где атрибут качества определяется одним или несколькими из фрагментации, окисления, гликирования, гидроксирования, варианта последовательности, изомеризации, дезаминирования, С-концевого лизина, О-связанного гликана и/или N-связанного гликана.

5. Система калибровки по п. 2, где один или несколько процессоров, связанных с первым прибором для MS, приспособлены для генерации отчета, содержащего атрибут качества.

6. Система калибровки по п. 1, где модель первого прибора отличается от модели второго прибора.

7. Система калибровки по п. 1, где первый набор настроек отличается от второго набора настроек.

8. Система калибровки по п. 1, где первый набор поправочных коэффициентов основан на значении интенсивности ионов первой изоформы референтного стандарта и первом значении количественного показателя в референтном стандарте первой изоформы референтного стандарта.

9. Система калибровки по п. 1, где первый набор поправочных коэффициентов обеспечивает калибровку коэффициента отклика, связанного с первым набором значений количественных показателей в образце, с определением значения интенсивности ионов изоформы первого образца.

10. Система калибровки по п. 1, где первый набор значений количественных показателей в образце дополнительно основан на значении интенсивности ионов изоформы первого образца.

11. Система калибровки по п. 1, где первый прибор с поддержкой МАМ представляет собой прибор для масс-спектрометрии (MS).

12. Система калибровки по п. 1, где первый прибор с поддержкой МАМ представляет собой трехквადрупольный прибор.

13. Система калибровки по п. 1, где один или несколько процессоров, связанных с первым прибором для MS, соединены с возможностью осуществления связи по компьютерной сети с одним или несколькими процессорами, связанными со вторым

прибором для MS.

14. Система калибровки по п. 1, где один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, представляют собой один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ.

15. Система калибровки по п. 1, где первый прибор с поддержкой МАМ расположен в первой лаборатории в первом географическом местоположении, а второй прибор с поддержкой МАМ расположен во второй лаборатории во втором географическом местоположении.

16. Способ калибровки для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (МАМ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом способ калибровки предусматривает:

прием в первом приборе с поддержкой МАМ, содержащем первый детектор, первого образца и референтного стандарта;

обнаружение посредством первого детектора изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, в течение первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего первой изоформе образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов, и где первый прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек;

прием во втором приборе с поддержкой МАМ, содержащем второй детектор, второго образца и референтного стандарта;

обнаружение посредством второго детектора изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, в течение второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и где второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора

или (2) второго набора настроек,

где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора, и

где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

17. Способ калибровки для уменьшения изменчивости прибора с поддержкой МАМ в течение нескольких периодов времени посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом способ калибровки предусматривает:

прием в приборе с поддержкой МАМ в течение первого периода времени первого образца и референтного стандарта;

обнаружение посредством детектора прибора с поддержкой МАМ в течение первого периода времени изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров в течение первой итерации МАМ в течение первого периода времени первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров посредством первой итерации МАМ в течение первого периода времени первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов, и где прибор с поддержкой МАМ в течение первого периода времени характеризуется состоянием первого прибора, определенным первым набором настроек;

прием в приборе с поддержкой МАМ в течение второго периода времени второго образца и референтного стандарта;

обнаружение посредством детектора прибора с поддержкой МАМ в течение второго периода времени изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров в течение второй итерации МАМ в течение второго периода времени второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте; и

определение посредством одного или нескольких процессоров посредством второй итерации МАМ в течение второго периода времени второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и где прибор с поддержкой МАМ в течение второго периода времени характеризуется состоянием второго прибора, определенным вторым

набором настроек,

где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора, и

где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

18. Способ калибровки по п. 17, где один или несколько процессоров определяют атрибут качества.

19. Способ калибровки по п. 18, где атрибут качества представляет собой любое из изоформы первого образца, изоформы второго образца, белка или идентифицированной примеси.

20. Способ калибровки по п. 18, где один или несколько процессоров приспособлены для генерации отчета об атрибуте качества.

21. Система калибровки по п. 1, где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается на по меньшей мере 25 процентов.

22. Способ калибровки по п. 16, где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается на по меньшей мере 25 процентов.

23. Способ калибровки по п. 17, где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается на по меньшей мере 25 процентов.

24. Система калибровки по п. 1, где первый образец представляет собой протеолитический пептид, второй образец протеолитического пептида, и референтный стандарт представляет собой протеолитический пептид.

25. Способ калибровки по п. 16, где первый образец представляет собой протеолитический пептид, второй образец протеолитического пептида, и референтный стандарт представляет собой протеолитический пептид.

26. Способ калибровки по п. 17, где первый образец представляет собой протеолитический пептид, второй образец протеолитического пептида, и референтный стандарт представляет собой протеолитический пептид.

27. Система калибровки, приспособленная для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (ММ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом система калибровки содержит:

первый прибор с поддержкой ММ, содержащий первый детектор, при этом первый прибор с поддержкой ММ характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек, при этом первый прибор с поддержкой ММ приспособлен для приема первого образца и референтного стандарта, и первый прибор с поддержкой ММ

дополнительно приспособлен для обнаружения посредством первого детектора изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте, где первый образец подготовлен посредством первого типа подготовки;

один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте, и один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов;

второй прибор с поддержкой МАМ, содержащий второй детектор, при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек,

где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора,

при этом второй прибор с поддержкой МАМ приспособлен для приема второго образца и референтного стандарта, и второй прибор с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен для обнаружения посредством второго детектора изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте, где второй образец подготовлен посредством второго типа подготовки, и

где первый тип подготовки отличается от второго типа подготовки образцов, что приводит к вариации между первым образцом и вторым образцом, при этом вариация вызвана искусственным изменением количественного показателя атрибута в ходе подготовки образцов; и

один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте, и один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и

где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных

коэффициентов,

где меньшей мере один из (1) одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, посредством первой итерации МАМ или из (2) одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, посредством второй итерации МАМ определяет атрибут качества с уменьшением вариации между первым образцом и вторым образцом, при этом атрибут качества связан с атрибутом 2 типа или атрибутом 3 типа.

28. Система калибровки по п. 27, где атрибут 2 типа обуславливает уменьшение количественного показателя в ходе подготовки первого образца или второго образца.

29. Система калибровки по п. 27, где атрибут 3 типа обуславливает увеличение количественного показателя в ходе подготовки первого образца или второго образца.

30. Способ калибровки для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (МАМ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом способ калибровки предусматривает:

прием в первом приборе с поддержкой МАМ первого образца и референтного стандарта, при этом первый прибор с поддержкой МАМ содержит первый детектор и первый прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек;

определение посредством первого детектора первого прибора с поддержкой МАМ изоформы первого образца в первом образце и первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте, где первый образец подготовлен посредством первого типа подготовки;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, в течение первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов;

прием во втором приборе с поддержкой МАМ второго образца и референтного стандарта, при этом второй прибор с поддержкой МАМ содержит второй детектор, при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек, где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора;

обнаружение посредством второго детектора второго прибора с поддержкой МАМ изоформы второго образца во втором образце и второй изоформы референтного стандарта

в референтном стандарте, где второй образец подготовлен посредством второго типа подготовки, и где первый тип подготовки отличается от второго типа подготовки образцов, что приводит к вариации между первым образцом и вторым образцом, при этом вариация вызвана искусственным изменением количественного показателя атрибута в ходе подготовки образцов;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, в течение второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте; и

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов;

где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов, и

где меньшей мере один из (1) одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, посредством первой итерации МАМ или из (2) одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, посредством второй итерации МАМ определяет атрибут качества с уменьшением вариации между первым образцом и вторым образцом, при этом атрибут качества связан с атрибутом 2 типа или атрибутом 3 типа.

31. Способ калибровки по п. 30, где атрибут 2 типа обуславливает уменьшение количественного показателя в ходе подготовки первого образца или второго образца.

32. Способ калибровки по п. 30, где атрибут 3 типа обуславливает увеличение количественного показателя в ходе подготовки первого образца или второго образца.

33. Система калибровки, приспособленная для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (МАМ) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом система калибровки содержит:

первый прибор с поддержкой МАМ, содержащий первый детектор, при этом первый прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек, при этом первый прибор с поддержкой МАМ приспособлен для приема первого образца, референтного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию стандарта, и при этом первый прибор с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен для обнаружения посредством первого детектора изоформы первого образца в первом образце, первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте и изоформы

подвергнутого стрессовому воздействию референтного стандарта в подвергнутом стрессовому воздействию стандарте;

один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством первой итерации МАМ первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте и подвергнутом стрессовому воздействию стандарте, и один или несколько процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определения первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов;

второй прибор с поддержкой МАМ, содержащий второй детектор, при этом второй прибор с поддержкой МАМ характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек,

где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора,

при этом второй прибор с поддержкой МАМ приспособлен для приема второго образца и референтного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию стандарта, и второй прибор с поддержкой МАМ дополнительно приспособлен для обнаружения посредством второго детектора изоформы второго образца во втором образце, второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте, и второй изоформы подвергнутого стрессовому воздействию стандарта в подвергнутом стрессовому воздействию стандарте; и

один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, при этом один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, приспособлены для определения посредством второй итерации МАМ второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте и подвергнутом стрессовому воздействию стандарте, и один или несколько процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МАМ, дополнительно приспособлены для определению второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов, и

где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

34. Система калибровки по п. 33, где подвергнутый стрессовому воздействию

стандарт содержит более высокий уровень атрибутов качества по сравнению с референтным стандартом.

35. Способ калибровки для уменьшения изменчивости многопараметрических способов (МAM) между лабораториями или между приборами посредством калибровки интенсивности сигналов в ходе работы, при этом способ калибровки предусматривает:

прием в первом приборе с поддержкой МAM первого образца, референтного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию стандарта, при этом первый прибор с поддержкой МAM содержит первый детектор, и первый прибор с поддержкой МAM характеризуется состоянием первого прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели первого прибора или (2) первого набора настроек;

определение посредством первого детектора первого прибора с поддержкой МAM изоформы первого образца в первом образце, первой изоформы референтного стандарта в референтном стандарте и изоформы подвергнутого стрессовому воздействию референтного стандарта в подвергнутом стрессовому воздействию стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МAM, в течение первой итерации МAM первого набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте и подвергнутом стрессовому воздействию стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных с первым прибором с поддержкой МAM, первого набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе первого образца, где первый набор значений количественных показателей в образце основан на первом наборе поправочных коэффициентов;

прием вторым прибором с поддержкой МAM второго образца, эталонного стандарта и подвергнутого стрессовому воздействию стандарта, при этом прибор с поддержкой МAM содержит второй детектор, и второй прибор с поддержкой МAM характеризуется состоянием второго прибора, определенным по меньшей мере одним из (1) модели второго прибора или (2) второго набора настроек, где состояние второго прибора отличается от состояния первого прибора;

обнаружение посредством второго детектора второго прибора с поддержкой МAM изоформы второго образца во втором образце, второй изоформы референтного стандарта в референтном стандарте и второй изоформы подвергнутого стрессовому воздействию стандарта в подвергнутом стрессовому воздействию стандарте;

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со вторым прибором с поддержкой МAM, в течение второй итерации МAM второго набора поправочных коэффициентов, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор поправочных коэффициентов основан на референтном стандарте и подвергнутом стрессовому воздействию стандарте; и

определение посредством одного или нескольких процессоров, связанных со

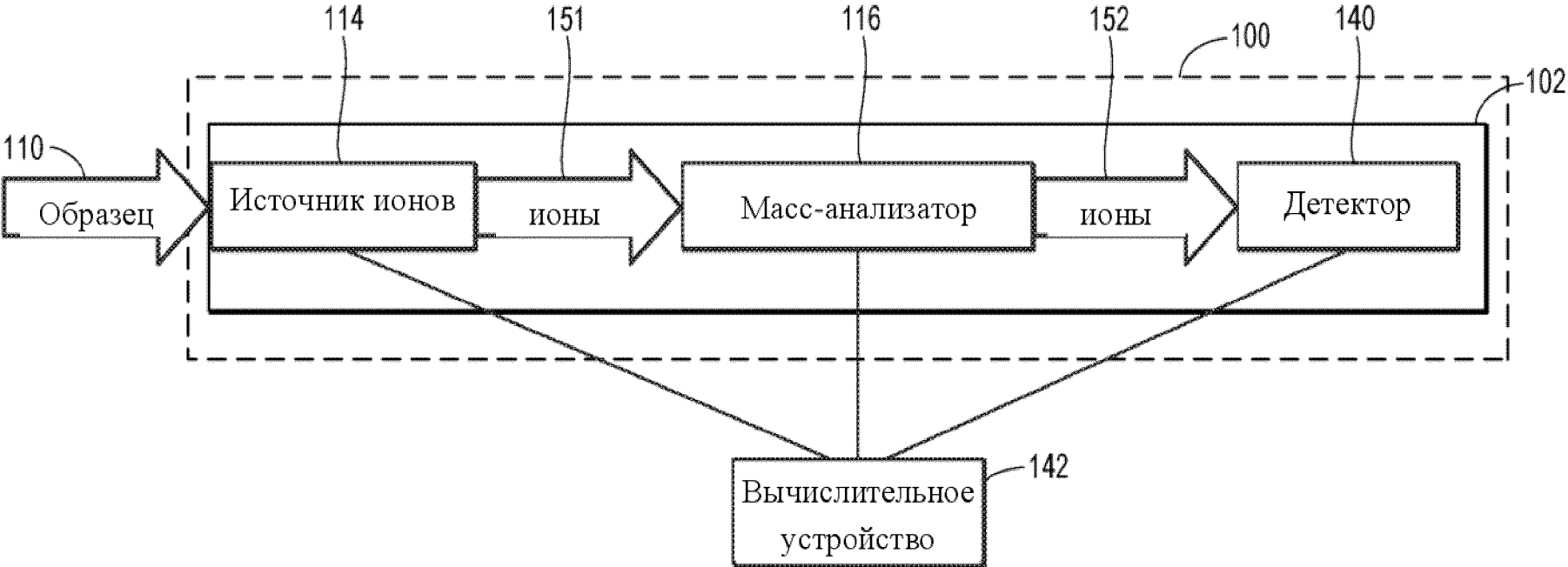
вторым прибором с поддержкой МАМ, второго набора значений количественных показателей в образце, соответствующего изоформе второго образца, где второй набор значений количественных показателей в образце основан на втором наборе поправочных коэффициентов;

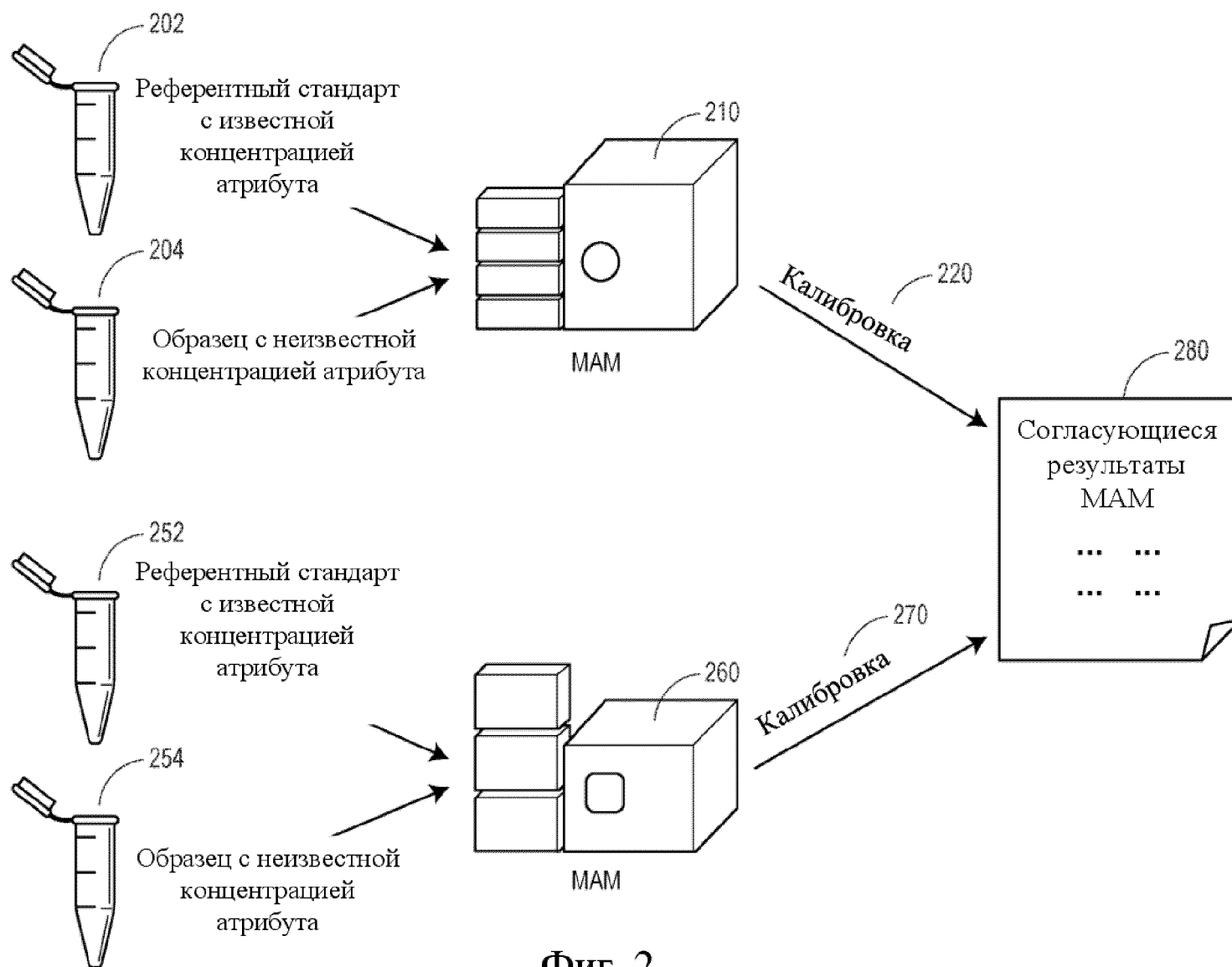
где значение вариации для первого набора значений количественных показателей в образце и второго набора значений количественных показателей в образце уменьшается с учетом первого набора поправочных коэффициентов и второго набора поправочных коэффициентов.

36. Способ калибровки по п. 35, где подвергнутый стрессовому воздействию стандарт содержит более высокий уровень атрибутов качества по сравнению с референтным стандартом.

По доверенности

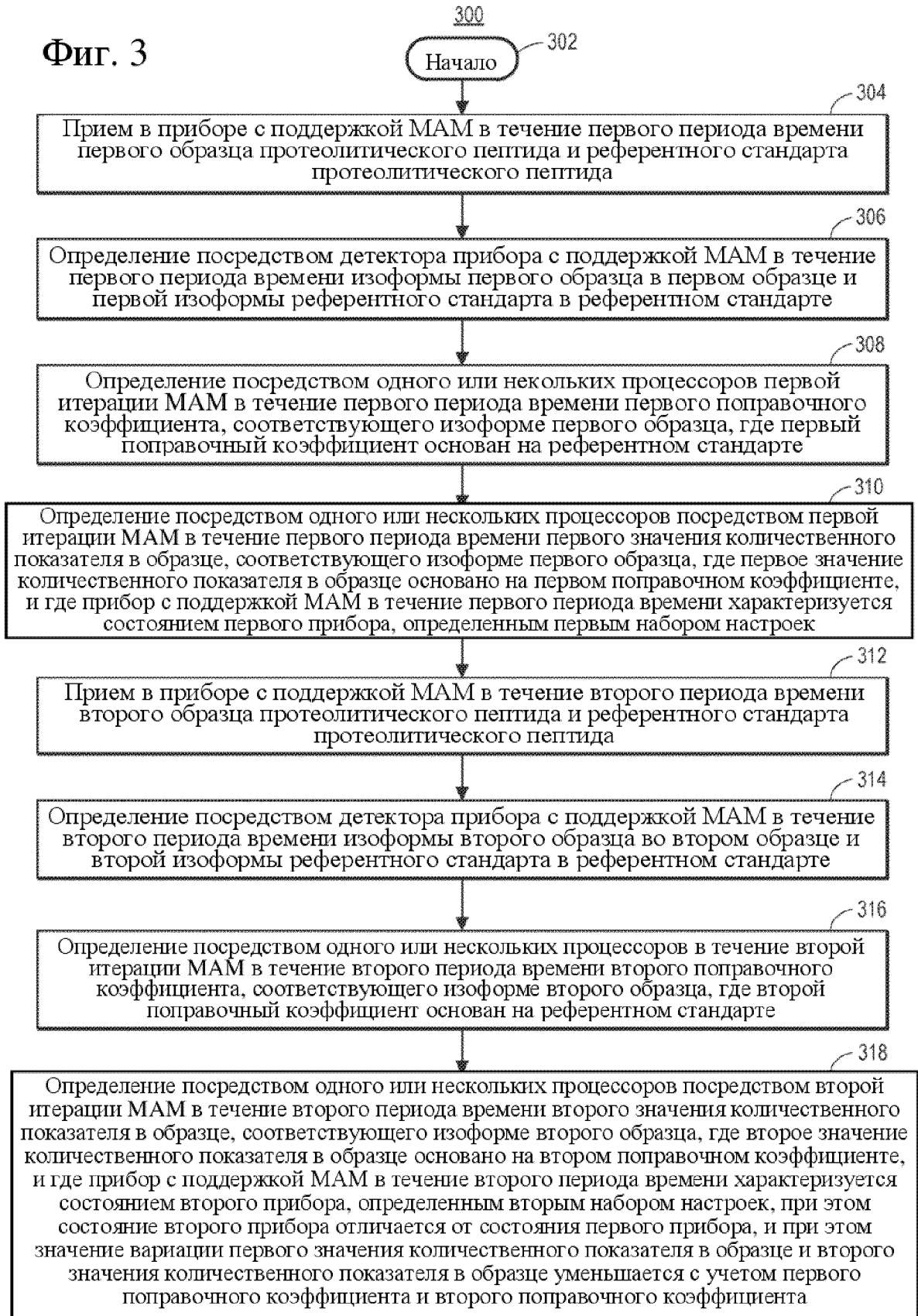
Фиг. 1



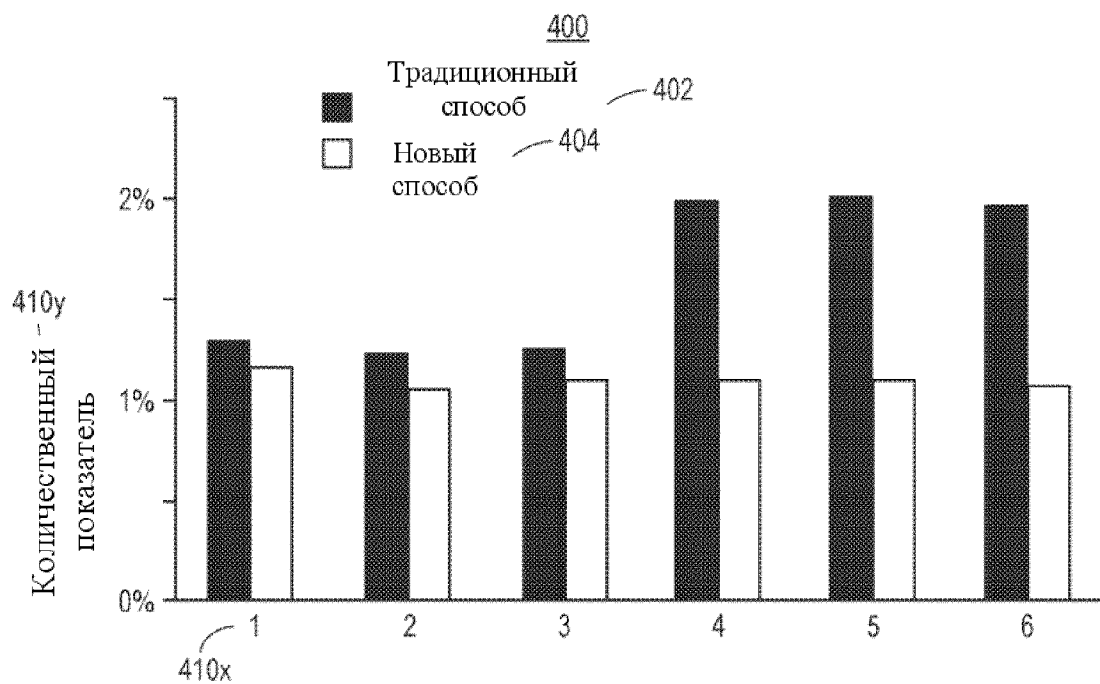


Фиг. 2

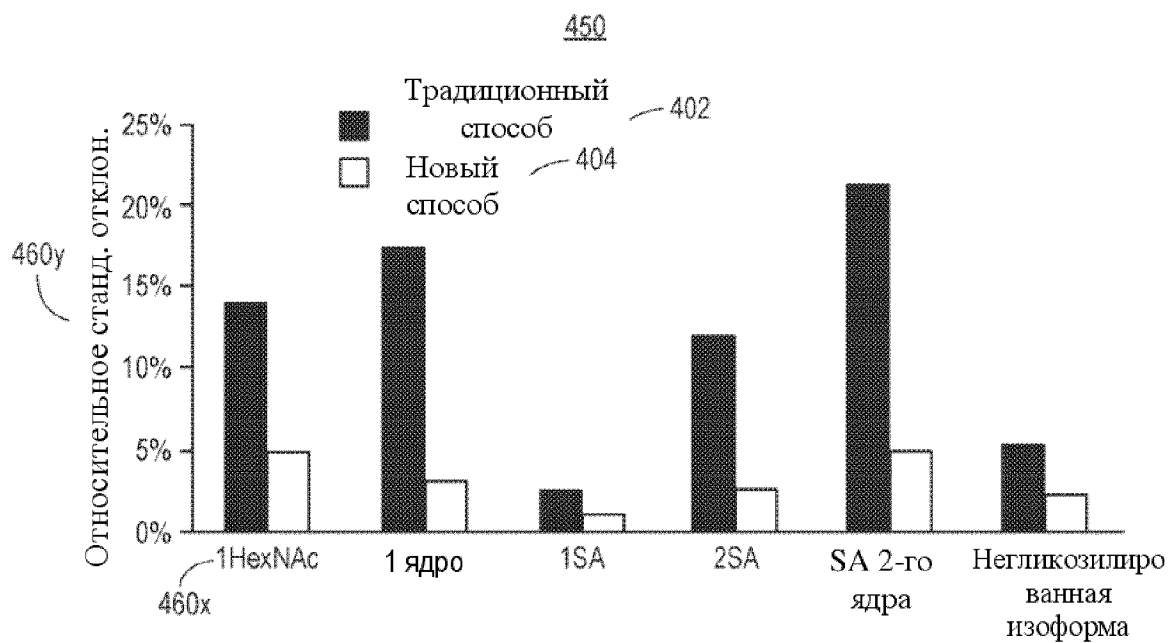
ФИГ. 3



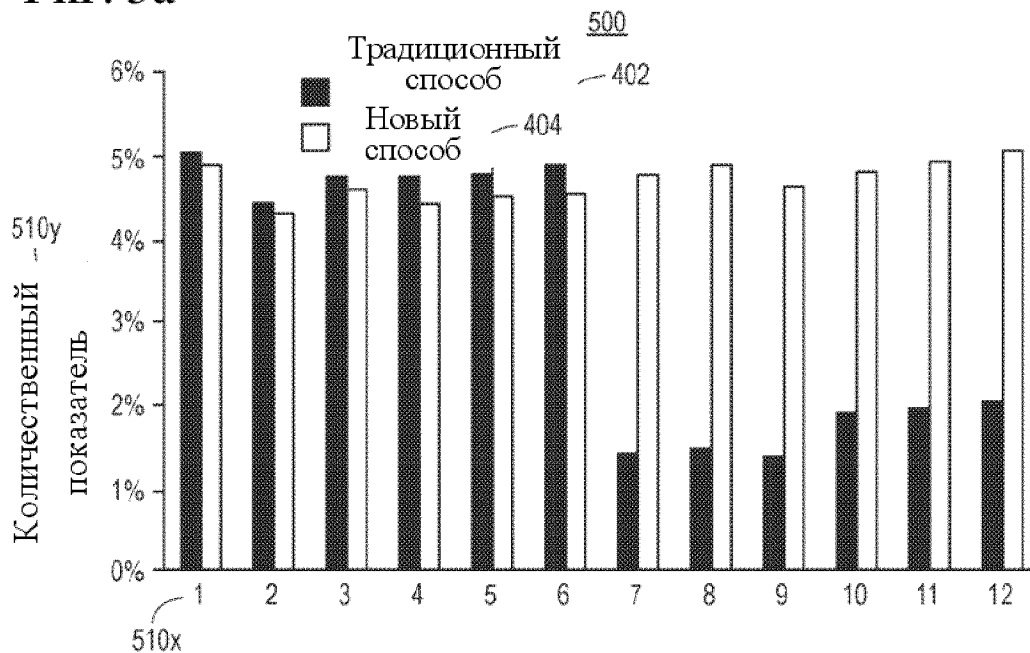
Фиг. 4а



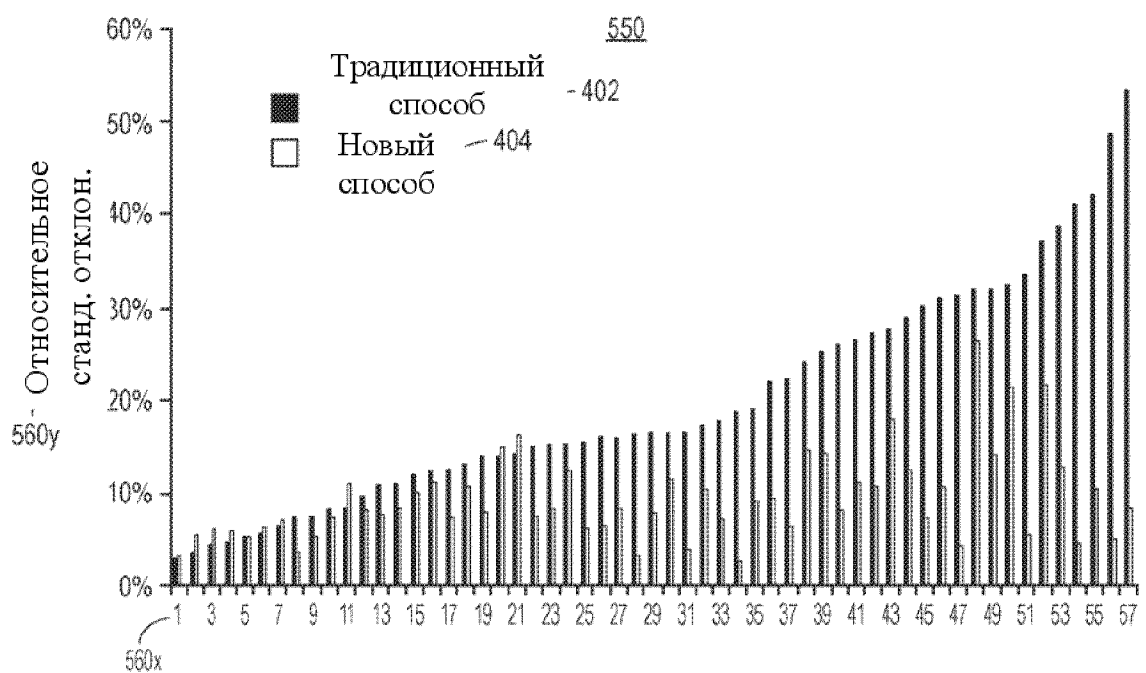
Фиг. 4b

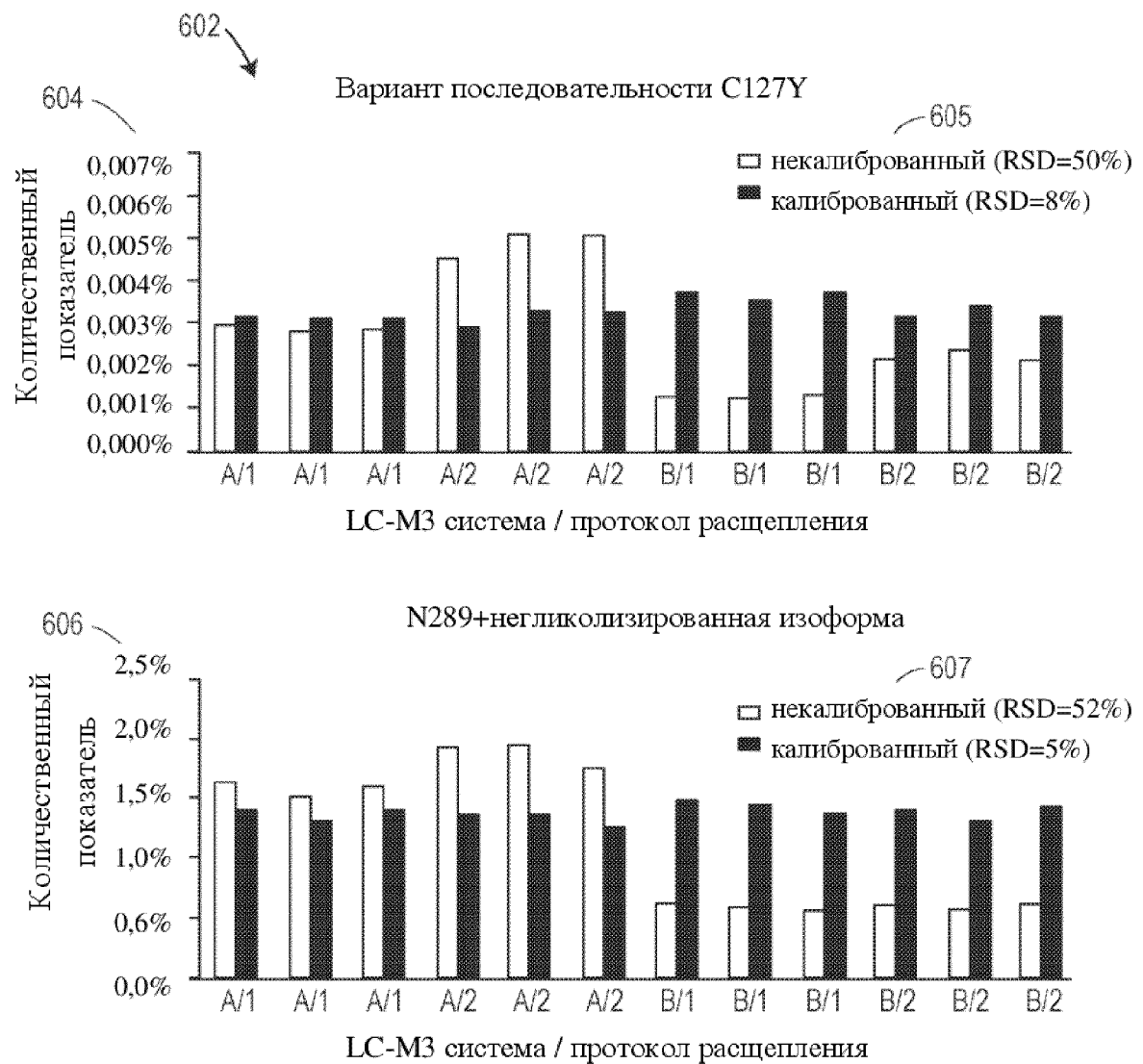


Фиг. 5а

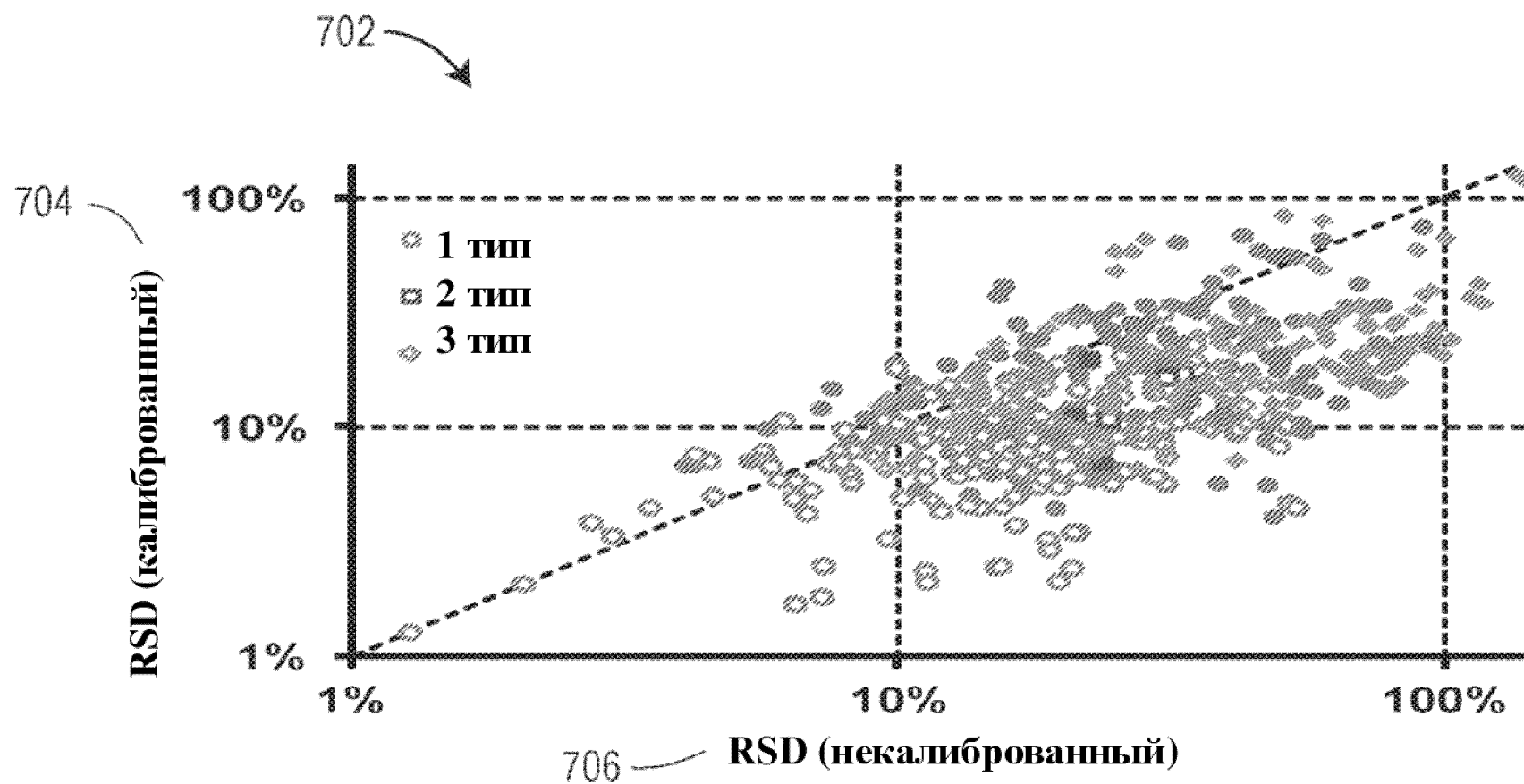


Фиг. 5b



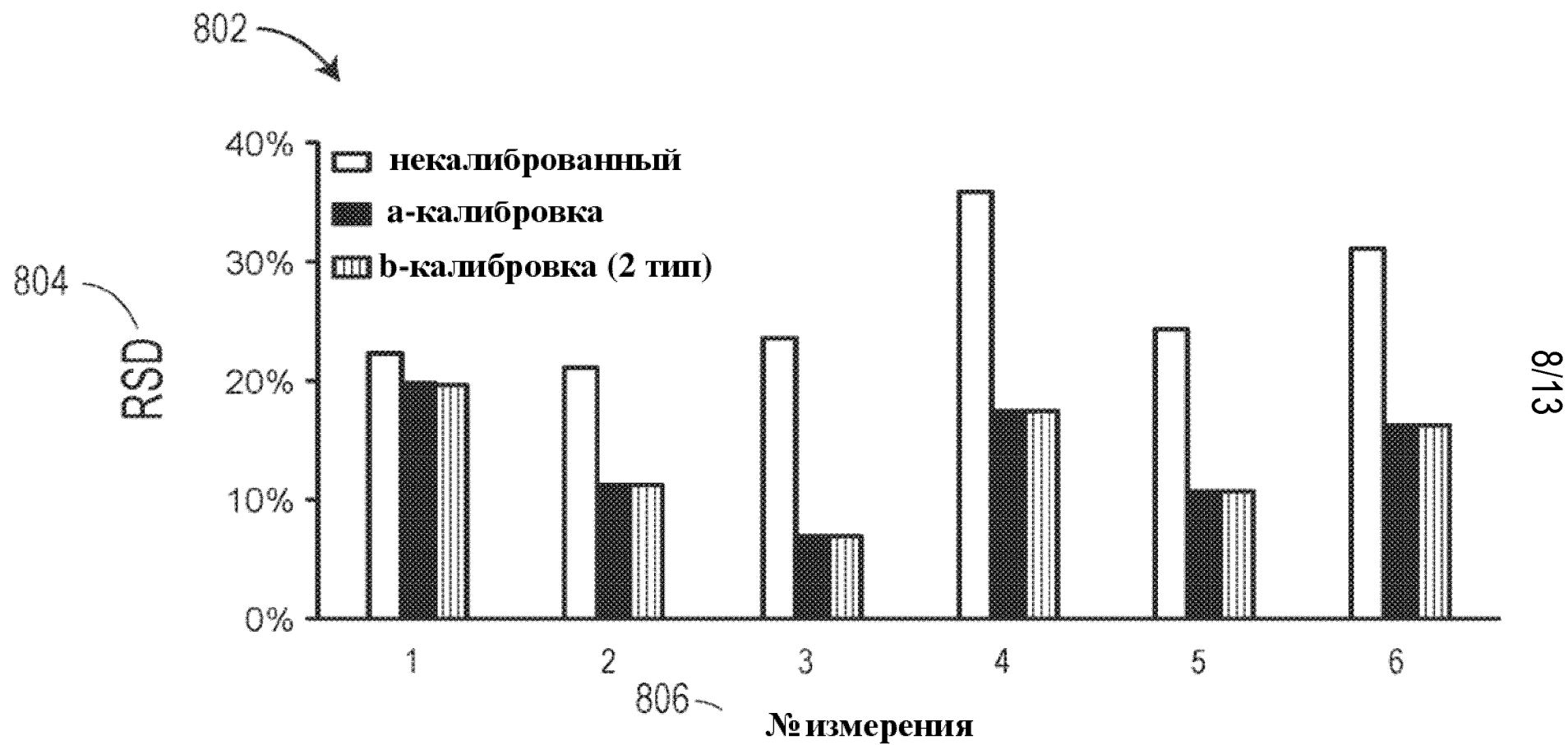


Фиг. 6

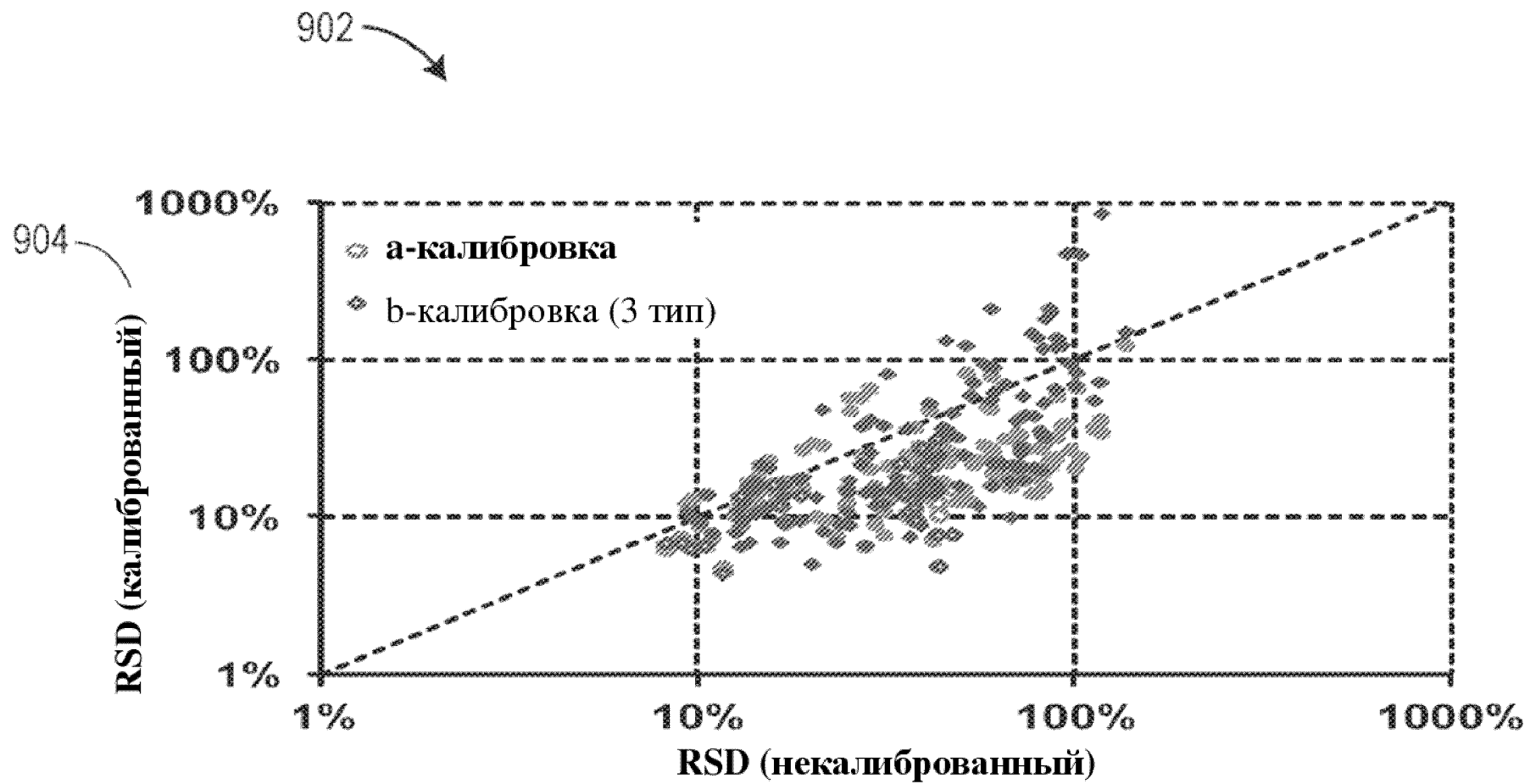


7/13

Фиг. 7



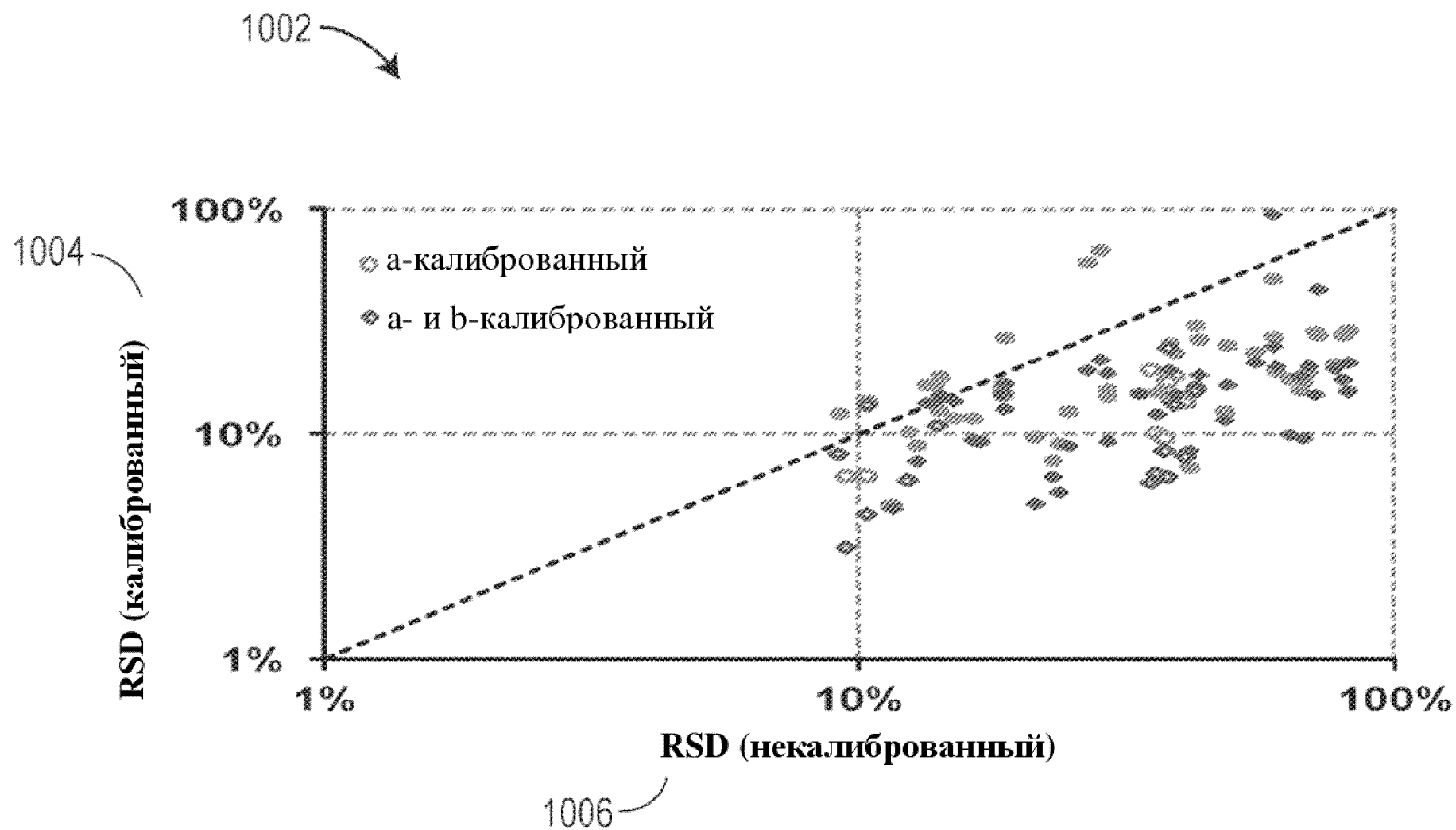
Фиг. 8



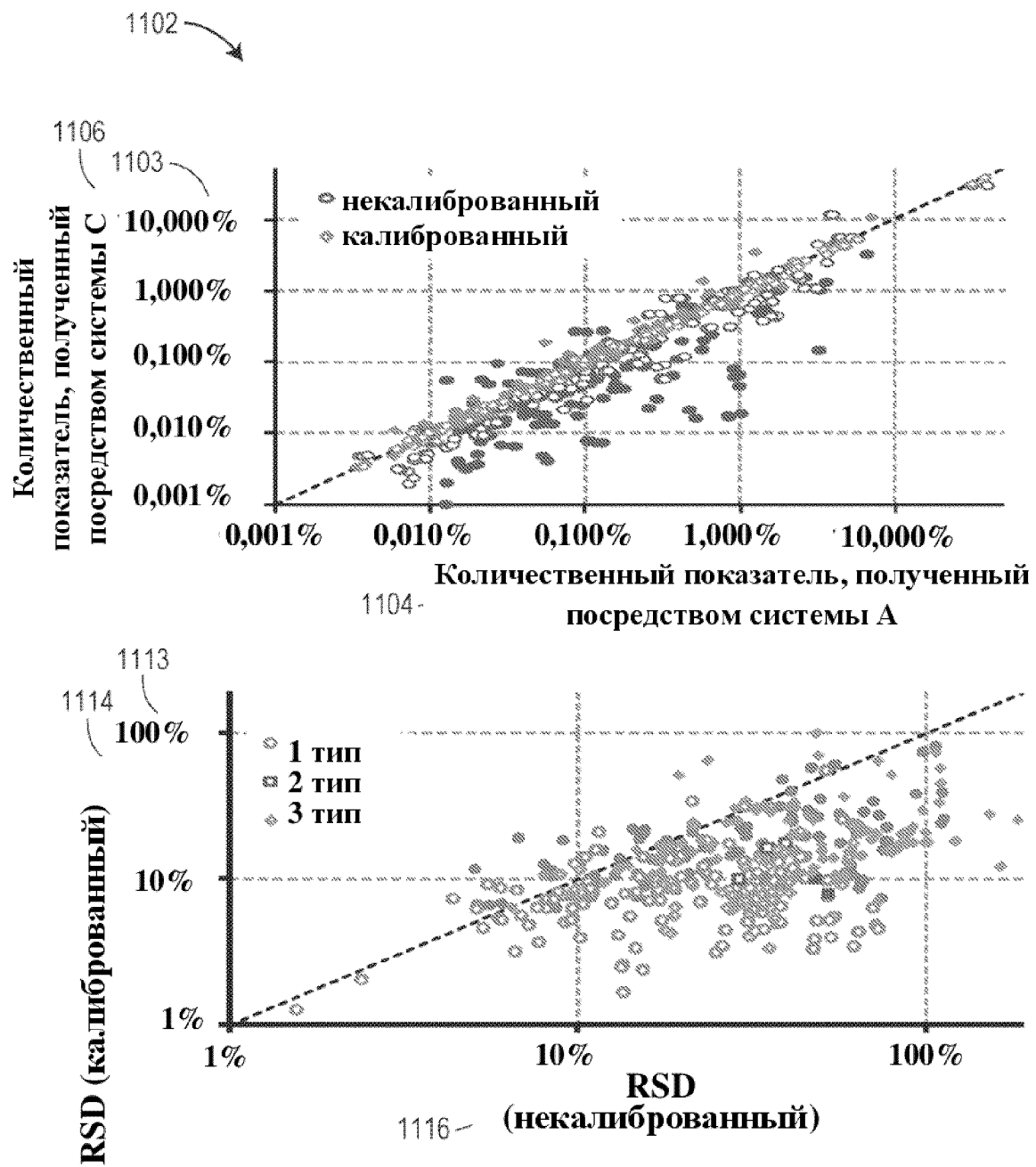
9/13

906

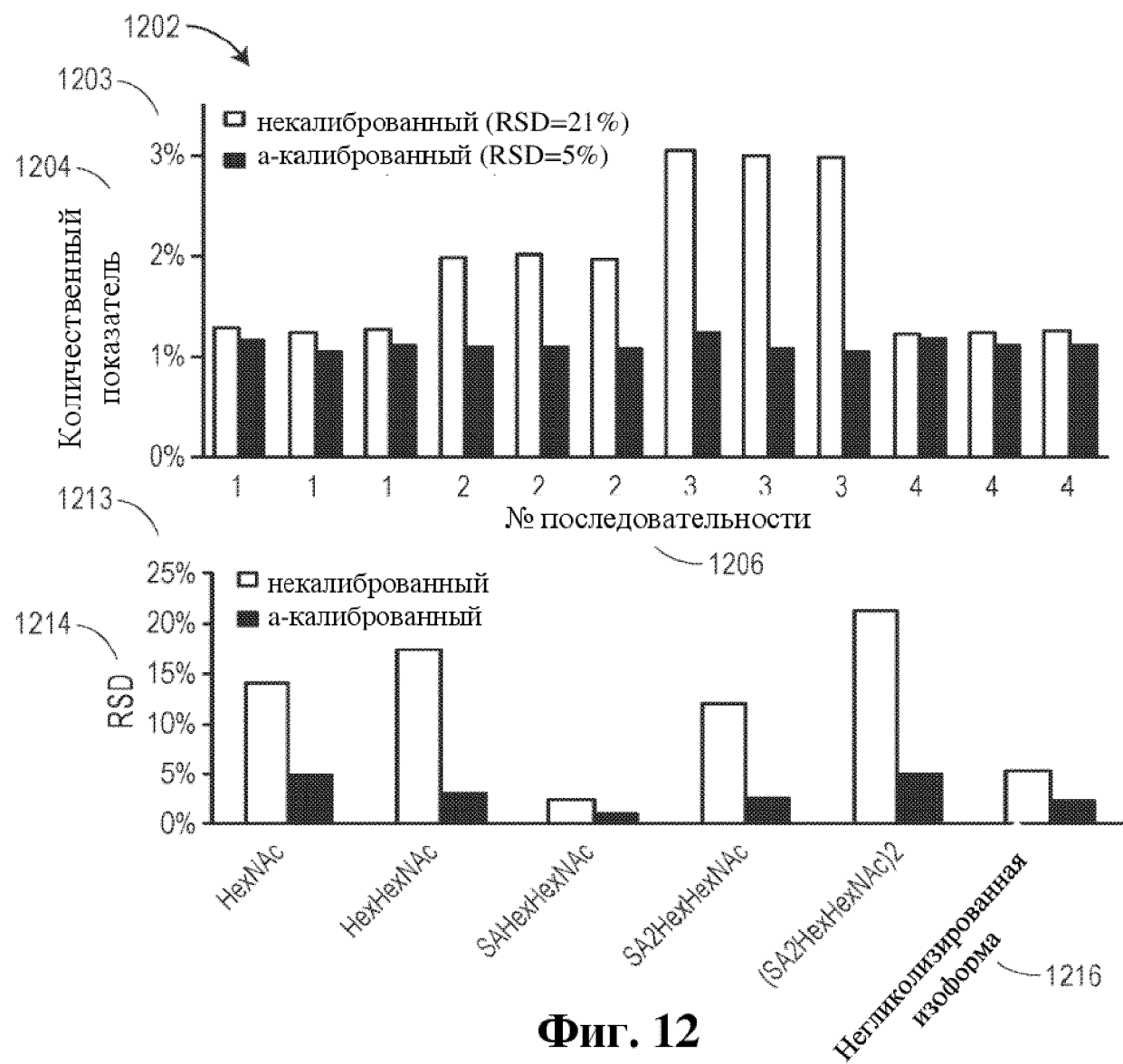
Фиг. 9



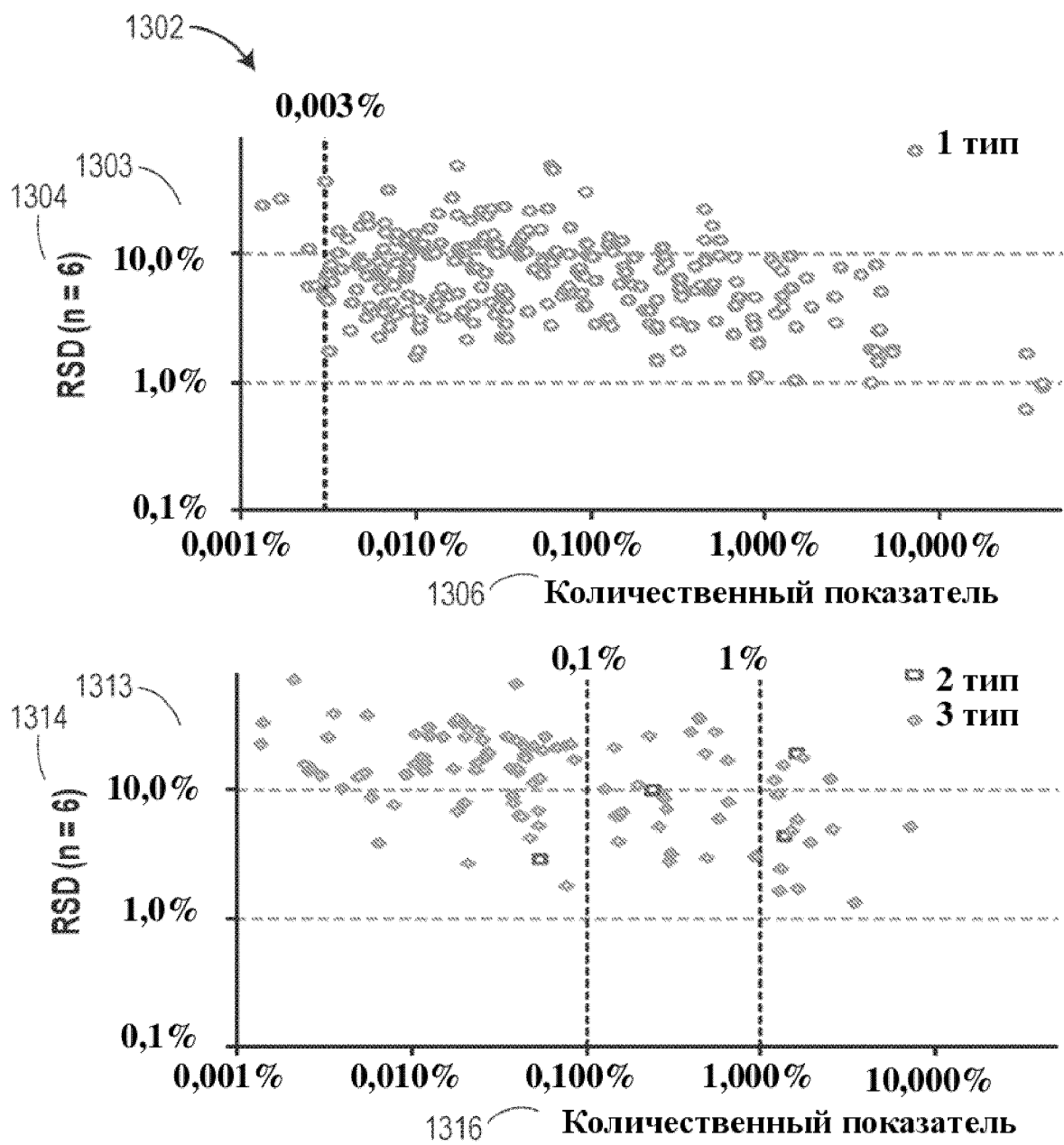
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13