

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190355** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.05.25

(51) Int. Cl. **C12Q 1/37 (2006.01)**
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.07

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ ЖХ-МС/МС ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ**

(31) **62/715,973**

(72) Изобретатель:
Е Соок Йен, Цю Хайбо, Ли Нин (US)

(32) **2018.08.08**

(33) **US**

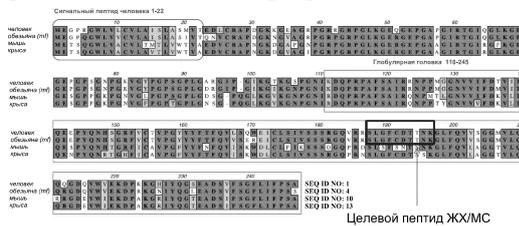
(86) **PCT/US2019/045494**

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

(87) **WO 2020/033537 2020.02.13**

(71) Заявитель:
**РИДЖЕНЕРОН
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(57) Согласно настоящему изобретению предложены способы и композиции для определения содержания и/или концентрации белковых биомаркеров в биологическом образце.



202190355
A1

202190355
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566953EA/061

ПРИМЕНЕНИЕ ЖХ-МС/МС ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВЫХ БИОМАРКЕРОВ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество согласно предварительной заявке США № 62/715973, поданной 8 августа 2018 г., содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в формате ASCII через EFS-Web и полностью включен в данный текст посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 29 июля 2019 г., называется «REGE-015-001WO_SeqList_ST25.txt» и имеет размер 50295 байтов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] C1q является важным белком, на который может быть мишенью лекарственных средств и который вовлечен в систему комплемента врожденной иммунной системы. В настоящее время существуют иммунологические способы определения концентрации C1q в биологических образцах, происходящих из организма человека. Однако существует ограниченное количество иммунореагентов для анализа содержания C1q в образцах, происходящих из организма приматов, отличных от человека, важного модельного организма в доклинических научных работах и исследованиях. Таким образом, в данной области техники существует потребность в способах и композициях, направленных на определение концентрации C1q в образцах, происходящих из организма человека, примата, отличного от человека, и других модельных организмов, которые являются быстрыми, специфичными и точными, а также не требуют дорогостоящей и длительной разработки иммунореагентов. Настоящее изобретение направлено на удовлетворение этих потребностей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0004] Согласно настоящему изобретению предложен анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце; и (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) для измерения содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[0005] Предыдущий анализ также может включать между этапом (1) и этапом (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента C1q, содержащего аминокислотную последовательность,

идентичную аминокислотной последовательности по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q.

[0006] Измерение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q в предыдущем анализе может включать сравнение сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептиду C1q, полученного с помощью МВР-МС, со стандартной кривой.

[0007] Согласно настоящему изобретению предложен анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце; (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[0008] Предшествующий анализ также может включать между этапом (1) и этапом (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, и между этапом (2) и этапом (3) выполнение МВР-МС с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному меченому синтетическому пептиду.

[0009] Биологический образец может представлять собой образец крови. Биологический образец может представлять собой человеческий образец. Биологический образец может представлять собой образец примата, отличного от человека.

[00010] По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать по меньшей мере 5 аминокислот. По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать пептид, выбранный из таблицы 2.

[00011] По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать по меньшей мере два из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). По меньшей мере один пептидный фрагмент может содержать SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

[00012] Масс-спектрометрия с мониторингом выбранных реакций может представлять собой ЖХ-МВР-МС/МС.

[00013] По меньшей мере один протеолитический фермент может представлять собой трипсин.

[00014] Стандартная кривая может быть получена с применением способа, включающего: (а) приготовление по меньшей мере двух стандартов концентрации C1q путем смешивания известных количеств очищенного белка C1q и сыворотки, истощенной по C1q; (b) добавление к указанным по меньшей мере двум стандартам концентрации C1q по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, который, как ожидается, будет получен после приведения стандарта концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом; (с) приведение по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q; (d) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций для определения интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, и интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному меченому синтетическому пептидному фрагменту, в каждом из по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q; и (е) определение стандартной кривой с использованием сигналов и известных количеств белка C1q.

[00015] Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, причем указанная композиция содержит по меньшей мере один выделенный синтетический пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из белка C1q.

[00016] Композиция, содержащая по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, причем указанная композиция содержит по меньшей мере один выделенный синтетический пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из белка C1q, при этом указанная аминокислотная последовательность, выбранная из белка C1q, представляет собой последовательность пептидного фрагмента C1q, полученного путем приведения C1q в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом.

[00017] Белок C1q может быть получен из организма человека. Белок C1q может быть получен из организма примата, отличного от человека.

[00018] По меньшей мере один выделенный синтетический пептид может содержать по меньшей мере 5 аминокислот.

[00019] Аминокислотная последовательность, выбранная из белка C1q, может представлять собой последовательность пептидного фрагмента C1q, полученного путем приведения C1q в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом. По меньшей мере один протеолитический фермент может представлять собой трипсин.

[00020] По меньшей мере один выделенный синтетический пептид может содержать метку.

[00021] По меньшей мере один выделенный синтетический пептид может содержать пептид, выбранный из таблицы 2.

[00022] По меньшей мере один выделенный синтетический пептид может содержать SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Цистеин в синтетическом пептиде SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26) может быть модифицирован. Модификация может представлять собой карбамидометилирование.

[00023] Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере одну переходную пару ионов, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну переходную пару ионов белка C1q, при этом указанная по меньшей мере одна переходная пара ионов состоит из иона-предшественника с соответствующим m/z и иона-фрагмента с соответствующим m/z иона.

[00024] Белок C1q может быть получен из организма человека. Белок C1q может быть получен из организма примата, отличного от человека.

[00025] Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере одну переходную пару ионов, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну переходную пару ионов белка C1q, при этом указанная по меньшей мере одна переходная пара ионов состоит из иона-предшественника с соответствующим m/z и иона-фрагмента с соответствующим m/z иона, и при этом указанная переходная пара ионов выбрана из переходной пары предшественника SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41) 571,8-942,3, переходной пары предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1 и переходной пары предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3. Любой из указанных выше аспектов может быть объединен с любым другим аспектом.

[00026] Если не указано иное, все технические и научные термины используются в настоящей заявке в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В данном описании формы единственного числа также включают множественное число, если контекст явно не указывает иное; в качестве примеров, подразумевается, что термины, обозначающие артикли (соотв. «a», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) относятся к единственному или множественному числу, и подразумевается, что термин «или» является включающим. Например, «элемент» означает один или более элементов. По всему описанию слово «содержащий» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», следует понимать, как подразумевающие включение указанного элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов, но не исключение любого другого элемента, целого числа или этапа, или группы элементов, целых чисел или этапов. «Примерно» можно понимать, как в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от указанного значения. Если иное не ясно из контекста, все числовые значения, представленные в настоящей заявке, модифицированы термином «примерно».

[00027] Несмотря на то, что при реализации или тестировании настоящего изобретения можно применять способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящей заявке, полностью включены посредством ссылки. Ссылки, цитированные в настоящей заявке, не считаются предшествующим уровнем техники заявленного изобретения. В случае противоречия преимущественную силу будет иметь данное описание, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут понятны на основании следующего подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00028] Вышеупомянутые и дополнительные признаки будут более понятны на основании следующего подробного описания, рассматриваемого вместе с сопроводительными чертежами.

[00029] Фигура 1 представляет собой выравнивание аминокислотной последовательности субъединицы A C1q человека, обезьяны, мыши и крысы.

[00030] Фигура 2 представляет собой выравнивание аминокислотной последовательности субъединицы B C1q человека, обезьяны, мыши и крысы.

[00031] Фигура 3 представляет собой выравнивание аминокислотной последовательности субъединицы C C1q человека, обезьяны, мыши и крысы.

[00032] Фигура 4 представляет собой калибровочную кривую, полученную с применением способов согласно настоящему изобретению и пептида, происходящего из субъединицы A белка C1q.

[00033] Фигура 5 представляет собой калибровочную кривую, полученную с применением способов согласно настоящему изобретению и пептида, происходящего из субъединицы B белка C1q.

[00034] Фигура 6 представляет собой калибровочную кривую, полученную с применением способов согласно настоящему изобретению и пептида, происходящего из субъединицы C белка C1q.

[00035] Фигура 7 представляет собой ряд хроматограмм ЖХ-МВР-МС/МС отобранных пептидов, происходящих из субъединиц A, B и C C1q в образце контрольного гидролизата, образце для двойного контроля, контрольном образце и образце для оценки нижнего предела количественного определения (LLOQ).

[00036] Фигура 8 представляет собой ряд хроматограмм ЖХ-МВР-МС/МС отобранных пептидов, происходящих из субъединиц A, B и C C1q, в образцах для оценки предела обнаружения (LOD) и LLOQ, показывающих соотношение сигнал/шум и значения ответа для выделенных пиков.

[00037] Фигура 9 представляет собой ряд хроматограмм ЖХ-МВР-МС/МС отобранных пептидов, происходящих из субъединиц A, B и C C1q, в образцах

контрольного гидролизата до и после анализа образца для оценки верхнего предела количественного определения (ULOQ).

[00038] Фигура 10 показывает хроматограммы ЖХ-МВР-МС/МС отобранных пептидов, происходящих из субъединиц А, В и С С1q, в стандартных растворах для двойного контроля (L00) с добавлением 2000 мкг/мл биспецифичного антитела, 20 мкг/мл биспецифичного антитела или без биспецифичного антитела, а также в образце LLOQ.

[00039] Фигура 11 представляет собой ряд диаграмм, показывающих относительный ответ С1q в образцах, инкубированных с биспецифичным антителом, измеренный с применением способов согласно настоящему изобретению.

[00040] Фигура 12 представляет собой ряд диаграмм, показывающих относительный ответ, измеренный для эндогенного С1q в образцах, разведенных при различных коэффициентах разведения в различных разбавителях, с применением способов согласно настоящему изобретению.

[00041] Фигура 13 представляет собой ряд диаграмм, показывающих относительный ответ, измеренный для С1q в образцах, разведенных при различных коэффициентах разведения в различных разбавителях, с применением способов согласно настоящему изобретению.

[00042] Фигура 14 представляет собой ряд диаграмм, показывающих точность концентрации С1q в образцах, подвергнутых трем циклам замораживания-оттаивания или хранившихся в автоматическом пробоотборнике в течение 48 часов, измеренной с применением способов согласно настоящему изобретению.

[00043] Фигура 15 показывает диаграмму, изображающую зависимость концентрации С1q от времени в образцах крови обезьян, получавших дозу, определенную с применением способов согласно настоящему изобретению и отобранного пептида, происходящего из субъединицы А С1q.

[00044] Фигура 16 показывает диаграмму, изображающую зависимость концентрации С1q от времени в образцах крови обезьян, получивших дозу, определенную с применением способов согласно настоящему изобретению и отобранного пептида, происходящего из субъединицы В С1q.

[00045] Фигура 17 показывает диаграмму, изображающую зависимость концентрации С1q от времени в образцах крови обезьян, получавших дозу, определенную с применением способов согласно настоящему изобретению и отобранного пептида, происходящего из субъединицы С С1q.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00046] Согласно настоящему изобретению предложены способы и композиции для определения содержания и/или концентрации белковых биомаркеров в биологическом образце. Согласно некоторым аспектам белковый биомаркер представляет собой белок С1q. Согласно некоторым аспектам способы согласно настоящему изобретению включают анализ с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с мониторингом выбранных реакций (ЖХ-МВР-МС).

[00047] Компонент комплемента 1q (C1q) представляет собой белковый комплекс, вовлеченный в систему комплемента, которая является частью врожденной иммунной системы. C1q вместе с C1r и C1s образует комплекс C1. C1q представляет собой белок массой 400 кДа, состоящий из 18 полипептидных субъединиц: шести А-субъединиц, шести В-субъединиц и шести С-субъединиц. Ингибиторы комплемента успешно используются в лечении нескольких заболеваний. Моноклональные антитела, нацеленные на C1q, являются перспективными в качестве терапии аутоиммунных заболеваний, вовлекающих классический путь комплемента. Для разработки подходов к лечению, нацеленному на C1q, необходимы способы определения концентрации уровней C1q в биологических образцах во время лабораторных научных работ и клинических исследований. В настоящее время определение содержания C1q в образцах человека требует использования иммуноанализов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Кроме того, существует ограниченное количество иммунореагентов для анализа C1q в образцах приматов, отличных от человека, которые являются важным аспектом доклинических научных работ и исследований. Таким образом, существует потребность в улучшенном анализе для определения концентрации C1q в биологических образцах, происходящих из организма человека, приматов, отличных от человека, и других модельных организмов.

[00048] Способы жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с мониторингом выбранных реакций (ЖХ-МВР-МС) являются особенно подходящими, поскольку способы ЖХ-МВР-МС обеспечивают как абсолютную структурную специфичность в отношении целевого белка, так и относительное или абсолютное измерение концентрации целевого белка при использовании подходящих внутренних стандартов.

[00049] Способы согласно настоящему изобретению

[00050] В настоящей заявке подробно описаны различные способы согласно настоящему изобретению.

[00051] Согласно настоящему изобретению предложен способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце; и (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) для измерения содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00052] Согласно некоторым аспектам предыдущий способ также может включать между этапом (1) и этапом (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента C1q, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q.

[00053] Согласно настоящему изобретению также предложен способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце; (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00054] Согласно некоторым аспектам предыдущий способ также может включать между этапом (1) и этапом (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, и между этапом (2) и этапом (3) выполнение МВР-МС с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному меченому синтетическому пептиду.

[00055] Согласно некоторым аспектам биологический образец может представлять собой образец крови. Согласно предпочтительным аспектам биологический образец может представлять собой образец сыворотки. Согласно некоторым аспектам биологический образец может представлять собой человеческий образец. В качестве альтернативы биологический образец может представлять собой образец примата, отличного от человека. Примат, отличный от человека, может представлять собой *Macaca fascicularis* или *Macaca mulatta*.

[00056] Согласно некоторым аспектам белок C1q может представлять собой белок C1q человека. Согласно другим аспектам белок C1q представляет собой белок C1q *Macaca fascicularis*. Согласно другому аспекту белок C1q может представлять собой белок C1q *Macaca mulatta*. Белок C1q может содержать любую из последовательностей, показанных в таблице 1.

[00057] **Таблица 1. Последовательности белков C1q**

Вид	Субъединица	Регистрационный № NCBI	Последовательность	SEQ ID NO
Человек (Homo sapiens)	A	NP_057075	MEGPRGWLVLCLVLAISL ASMVTEDLCRAPDGKK GEAGRPGRRGRPLKGE QGEPGAPGIRTGIQGLK GDQGEPSGPNPGKVG YGPSPGLGARGIPGIKG	1

		TKGSPGNIKDQPRPAFSA IRRNPMMGGNVVIFDTVI TNQEEPYNHSGRFVCT VPGYYYFTFQVLSQWEI CLSIVSSSRGQVRRSLGF CDTTNKGLFQVVSGGM VLQLQQGDQVWVEKDP KKGHIYQGSEADSVFSG FLIFPSA	
B	NP_000482	MMMKIPWGSIPVLMLLL LLGLIDISQAQLSCTGPP AIPGIPGIPGTPGPDGQPG TPGIKGEKGLPGLAGDH GEFGEKGDPIPGNPGK VGPKGPMGPKGGPGAP GAPGPKGESGDYKATQ KIAFSATRITINVPLRRDQ TIRFDHVITNMNNYEP RSGKFTCKVPGLYYFTY HASSRGNLCVNLMRGR ERAQKVVTFCDYAYNT FQVTTGGMVLKLEQGE NVFLQATDKNSLLGME GANSIFSGFLLFPDMEA	2
C	NP_758957	MDVGPSSLPHLGLKLLL LLLLPLRGQANTGCYG IPGMPGLPGAPGKDGYP GLPGPKGEPGIPAIPGIRG PKGQKGEPGLPGHPGKN GPMGPPGMPGVPGPMGI PGEPGEEGRYKQKFQSV FTVTRQTHQPPAPNSLIR FNAVLTPQGDYDTSTG KFTCKVPGLYYFVYHAS	3

			HTANLCVLLYRSGVKV VTFCGHTSKTNQVNSGG VLLRLQVGEEVWLAVN DYYDMVGIQGSDSVFSG FLLFPD	
Яванская макака (Macaca fasciculari s)	A	XP_015296582	MEGPQGWLVVCVLAISL ASIVTQNVCRAPDGKNG VAGRPGRPGRPGGLKGER GEPGAPGIRTGIQGLKG DQGEPGPSGNPGKVGYP GPSGPLGDRGIPGIKGIK GNPGNIKDQPRPAFSAIR RNPPMGGNVVIFDMVIT NQEOPYQNHSGRFVCTV PGYYYFTFQVVSEREICL SIVSSSRGQVRRSLGFCD TTNKGLFQVVSSGGMVL QLQRGDQVWVEKDPRK GNIYQGLEADSVFSGFLI FPSS	4
	B	XP_005544557	MMMKILWGSIPVLMML LLLGLLDVSWAQQSCTG PPAIPGTPGIPGTPGSDG QPGTPGIKGEKGLPGLA GDHGEFGEKGDPIPGN PGKVGPKGPMGPKGGP GAPGAPGPKGESGDYK ATQKIAFSATRVTNTPLR RDQTIRFDHVITNMNNN YEPRSGKFTCRVPGLYY FTYHASSRGNLCVKLMR GRERPQKVVTFCDYAY NTFQVTTGGMVLKLEQ GENVFLQATDKNSLLG MEGANSIFSGFLLFPDVE	5

			A	
	C	XP_015296579	MDVGPSSLPHLGLKLLL LLLLLPLRGQANTGCYG IPGMPGLPGAPGKDGHD GLPGPKGEPGIPAIPGTR GPKGQKGEPGTPGHPGK NGPMGPPGMPGVPGPM GIPGEPGEEGRYKQKYQ SVFTVARQTHQPPAPNS LIRFNAVL TNPQGDYDT STGKFTCKVPGLYYFVY HASHTANLCVLLYRGG VKVVTFCGHTSQANQV NSGGVLLRLQVGEEVW LGVNDYYDMVGIQGS SVFSGFLLFPD	6
Макака- pezyc (Macaca mulatta)	A	XP_014985904	MEGPQGWL VVCVLAISL ASIVTQNVCRAPDGKNG VAGRPGRPGRPGLKGER GEPGAPGIRTGIQGLKG DQGEPGPSGNPGKVGYP GPSGPLGDRGIPGIKGIK GNP GNIKDQPRPAFSAIR RNPPMGGNVVIFDMVIT NQEOPYQNHSGRFVCTV PGYYYFTFQVVSEREICL SIVSSSRGQVRRSLGFCD TTNKGLFQVVS GGMVL QLQRGDQVWVEKDPRK GNIYQGLEADSVFSGFLI FPST	7
	B	XP_014985910	MMMKILWGSIPVLMMLL	8

			LLLGLLDVSWAQQSCTG PPAIPGTPGIPGTPGSDG QPGTPGIKGEKGLPGLA GDHGEFGEKGDPIGN PGKVGPKGPMGPKGGP GAPGAPGPKGESGDYK ATQKIAFSATRTINTPLR RDQTIRFDHVITNMNNN YEPRSGKFTCRVPGLYY FTYHASSRGNLCVKLMR GRERPQKVVTFCDYAY NTFQVTTGGMVLKLEQ GENVFLQATDKNSLLG MEGANSIFSGFLLFPDVE A	
	C	NP_001253737	MDVGPSSLPHLGLKLLL LLLLPLRGQANTGCYG IPGMPGLPGAPGKDGHD GLPGPKGEPGIPAIPGTR GPKGQKGEPGTPGHPGK NGPMGPPGMPGVPGPM GIPGEPGEEGRYKQKYQ SVFTVARQTHQPPAPNS LIRFNAVLTNPQGDDYDT STGKFTCKVPGLYYFVY HASHTANLCVLLYRGG VKVVTFCGHTSQANQV NSGGVLLRLQVGEEVW LGVNDYYDMVGIQGS SVFSGFLLFPD	9
Мышь (Mus musculus)	A	NP_031598	METSQGWLVA CVLTMT LVWTV AEDVC RAPNGK DGAPGNPGRPGRPGLKG ERGEPGAAGIRTGIRGFK GDPGESGPPGKPGNVGL	10

			PGPSGPLGDSGPQGLKG VKGNPGNIRDQPRPAFS AIRQNPMTLGNVVIFDK VLTNQESPYQNHTGRFI CAVPGFYFNFQVISKW DLCLFIKSSSGGQPRDSL SFSNTNKGKGLFQVLAGG TVLQLRRGDEVWIEKDP AKGRIYQGTEADSIFSGF LIFPSA	
B	NP_033907		MKTQWGEVWTHLLLLL LGFLHVSWAQSSCTGPP GIPGIPGVPGVPGSDGQP GTPGIKGEKGLPGLAGD LGEFGEKGDGIPGTPG KVGPKGPVGPKGTPGPS GPRGPKGDSGDYGATQ KVAFSALRTINSPLRPNQ VIRFEKVITNANENYEPR NGKFTCKVPGLYYFTYH ASSRGNLCVNLVRGRDR DSMQKVVTFCDYAQNT FQVTTGGVVLKLEQEEV VHLQATDKNSLLGIEGA NSIFTGFLLPMDA	11
C	NP_031600		MVVGPSQCQPPCGLCLLL LFLALPLRSQASAGCY GIPGMPGMPGAPGKDG HDGLQGPKGEPGIPAVP GTRGPKGQKGEPMMPG HRGKNGPRGTSGLPGDP GPRGPPGEPGVEGRYKQ KHQSVFTVTRQTTQYPE ANALVRFNSVVTNPQG	12

			<p> HYNPSTGKFTCEVPGLY YFVYYTSHTANLCVHLN LNLARVASFCDHMFNSK QVSSGGVLLRLQRGDEV WLSVNDYNGMVGIEGS NSVFSGFLFPD </p>	
<p> Крыса (Rattus norvegicus) </p>	A	NP_001008515	<p> METSQGWLVACVLAVT LVWTV AEDVCRAPNGK DGVAGIPGRPGRPGLKG ERGEPGAAGIRTGIRGLK GDMGESGPPGKPGNVG FPGPTGPLGNSGPQGLK GVKGNPGNIRDQPRPAF SAIRQNPPTYGNVVVFD KVLTNQENPYQNRTHF ICAVPGFYFTFQVISKW DLCLSIVSSSRGQPRNSL GFCDTNSKGLFQVLAGG TVLQLQRGDEVWIEKDP AKGRIYQGTEADSIFSGF LIFPSA </p>	13
	B	NP_062135	<p> MKTQWSEILTPLLLLLL GLLHVSWAQSSCTGSPG IPGVPGIPGVPGSDGKPG TPGIKGEKGLPGLAGDH GELGEKGDAGIPGIPGK VGPKGPVGPKGAPGPPG PRGPKGGSGDYKATQK VAFSALRTVNSALRPNQ AIRFEKVITNVNDNYEPR SGKFTCKVPGLYYFTYH ASSRGNLCVNIVRGRDR DRMQKVLTFCDYAQNT FQVTTGGVVLKLEQEEV </p>	14

			VHLQATDKNSLLGVEG ANSIFTGFLLPDMDV	
	C	NP_001008524	MVVGTSQCQPQHGLYLL LLLLALPLRSQANAGCY GIPGMPGLPGTPGKDGH DGLQGPKGEPGIPAIPGT QGPKGQKGEPGMPGHR GKNGPMGTSGSPGDPPG RGPPGEPGEEGRYKQKH QSVFTVTRQTAQYPAAN GLVKFNSAITNPQGDYN TNTGKFTCKVPGLYYFV HHTSQTANLCVQLLNN AKVTSFCDHMSNSKQVS SGGVLLRLQRGDEVWL AVNDYNGMVGTEGSDS VFSGFLFPD	15
Собака (Canis lupus familiaris)	A	XP_535367	MEAPWGWLALCVLATS LASAVTQDVCRALDGR DGAAGTPGRPGRPGLKG EQGEPGAPGMRTGIRGL KGDQGDGPPGNPGNM GFPGPSGLMGLPGIPGRR GPKGNGNIRDQPRPAF SAIRRNPTGGNVVIFDT VITNQEOPYQNHSGRFIC AVPGYYYFTFQVVSKW DICLSIVSSGRAQIRRS LG FCDTNSKGIFQVVS GGM ALQLQQGDQVWIEKDPI KGRIYQGPEADSIFSGFLI FPSL	16
	B	XP_544507	MKTPRGGILALLLPLL GLLEVSWAQSCTGHPAI	17

			PGIPGIPGAPGTDGTPGT PGTKGEKGLPGLAGDH GEFGEKGDPGIPGTPGK VGPKGPVGPKGSPGPPG ARGAKGESGDYKATQKI AFSAMRTINIPLRRDQTI RFDHIVTNENRNYEPRS GKFTCNVPGIYYFAYHA SSRGNLCVNVMRGRER MQKVVTFCDYVQNTFQ VTTGSVVLKLSQGENVY LQATDKNSLLGMEGAN SIFSGFLLFPDAEA	
	C	XP_003433793	MDTGPSSWPHLGLNLLL LLLALPLGGQASTGCYG IPGMPGLPGAPGKDGHD GLPGPKGEPGIPAIPGTR GPKGQKGEPGTPGYPGK NGPMGTPGIPGVPGVPG PPGEPGEEGRYKQKHQS VFTVTRQTAQYPLANNL VKFNTVITNPQGDYDTS TGKFTCKVPGLYYFVYH TSLTSNLCVHLYRSGTR VTTFCDHMSNSKQVSSG GVLLRLQMGEQVWLAV NDYNGMVGTEGSDSVF SGFLLFPD	18
Данио (Danio rerio)	A	ACN62221	MQPSAFFAFLWAGALFP FSFCQDECVKHGRNGA DGPNGRDGLPGPKGEK GEPALQVKLSSIALEELK GDMGVRGPPGEPGLEGL MGAIGPRGPLGPAGPRG SSVGADGAKASEKPAFS	19

			VLRNEASQAQYKQPVTF NDKLSDANDDFQIKTGY FTCKVPGVYYFVFHASS EGRLCLRLKSTSAPPVSL SFCDFNSKSVSLVVSGG AVLTLLKGDVWIEPFA GDGGVGQMPKRLYAVF NGFLIYRNAE	
	B	ACN62222	MLFALMSAHVVPQLAI MLLLVTSSMSETCAGNK GFPGTPGIPGVPGTDGK DGAKEKGDPGENEVQ MTGPKGDPGKPLPGRP GVKGPEGPQPPGPPGP KGQRGVLSGKVAPDQY FVFSYKKSQKLEKILQD KLVVFDVPLITGIDGULD GEGYFDVTITGMYIISY QISFQQSACLKIQIGAE KVKFCDSPKLILGTAAS VVLKLNKGDKVSQST GESTVFSRDTDCTFTGF MLFPIK	20
	C	ACN62223	MFGGHLILVSLLSASLCL CLASADTCPAGAMPGLP GIPGFPRDGRQGMKGE KGDLGPIKPGDTVKKG ERGAFLKGPGRGPH GDPGIMGPPGPPGEPGE AGLVDVSGSQLQSAFSV SRHTRIPDANKVIRFSK VITNPQGHFSTDESKFVC KIPGTYYFVLHASSHDK KLCVILVHDDKNLVSFC DHTQRGSQQVSSGGLSL	21

			YLKENEKVVWLMTNALN GMYATADRADSVFSGF LIHAN	
--	--	--	--	--

[00058] Согласно некоторым аспектам предыдущих способов по меньшей мере один пептидный фрагмент белка C1q содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 20 аминокислот.

[00059] Согласно некоторым аспектам предыдущих способов по меньшей мере один пептидный фрагмент белка C1q содержит пептид, выбранный из таблицы 2. Согласно другим аспектам по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит триптический пептид белка C1q.

[00060] **Таблица 2. Последовательности пептидов C1q**

Последовательность пептида	Субъединица C1q	SEQ ID NO
VGYPGSPGPLGAR	A	22
DQPRPAFSAIR*	A	23
NPPMGGNVVIFDTVITNQEEPQNHSGR	A	24
FVCTVPGYYYFTFQVLSQWEICLSIVSSSR	A	25
SLGFCDTTNK*	A	26
GLFVVSGGMVLQLQQGDQVWVEKDPK	A	27
GHIYQGSEADSVFSGFLIFPSA	A	28
IAFSATR*	B	29
TINVPLRR	B	30
FDHVITNMNNNYEPR*	B	31
VPGLYYFTYHASSR*	B	32
GNLCVNLMR	B	33
LEQGENVFLQATDK*	B	34
FQSVFTVTR	C	35
QTHQPPAPNSLIR*	C	36
FNAVLTNPQGDYDTSTGK*	C	37
VPGLYYFVYHASHTANLCVLLYR*	C	38
VVTFCGHTSK	C	39
TNQVNSGGVLLR	C	40

*обозначает общий пептид C1q человека/обезьяны.

[00061] Согласно некоторым аспектам предыдущих способов по меньшей мере один пептидный фрагмент белка C1q содержит SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Согласно другим аспектам по

меньшей мере один пептидный фрагмент содержит по меньшей мере два из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Согласно другим аспектам по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит каждый из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

[00062] Таким образом, настоящее изобретение включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит каждый из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (2) выполнение MBP-МС с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим каждую из переходной пары предшественника SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26) 571,8-942,3, переходной пары предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1 и переходной пары предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00063] Настоящее изобретение также включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит каждый из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности каждого из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (3) выполнение MBP-МС с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим каждую из переходной пары предшественника SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26) 571,8-942,3, переходной пары предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1 и переходной пары предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3, и сигнал, соответствующий по меньшей мере одному меченому синтетическому пептиду; и (4) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00064] Настоящее изобретение также включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26); (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (MBP-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим переходную пару предшественника SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41) 571,8-942,3; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения нормированного сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00065] Настоящее изобретение также включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26); (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26); (3) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (MBP-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим переходную пару предшественника SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41) 571,8-942,3, и сигнал, соответствующий по меньшей мере одному меченому синтетическому пептиду; и (4) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения нормированного сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00066] Настоящее изобретение также включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит IAFSATR (SEQ ID NO: 29); (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (MBP-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим переходную пару предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем

сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00067] Настоящее изобретение также включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит IAFSATR (SEQ ID NO: 29); (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности IAFSATR (SEQ ID NO: 29); (3) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (MBP-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим переходную пару предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1, и сигнал, соответствующий по меньшей мере одному меченому синтетическому пептиду; и (4) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00068] Настоящее изобретение также включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (MBP-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы MBP-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим переходную пару предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3; и (3) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00069] Настоящее изобретение также включает способ, включающий анализ, включающий: (1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце, причем указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (2) добавление к биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента, содержащего аминокислотную

последовательность, идентичную аминокислотной последовательности QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); (3) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) с получением сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, причем указанные сигналы МВР-МС соответствуют переходным парам ионов, содержащим переходную пару предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3, и сигнал, соответствующий по меньшей мере одному меченому синтетическому пептиду; и (4) определение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q путем сравнения сигнала со стандартной кривой, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в биологическом образце.

[00070] Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению масс-спектрометрия с мониторингом выбранных реакций представляет собой ЖХ-МВР-МС/МС.

[00071] Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению по меньшей мере один протеолитический фермент представляет собой трипсин. Другие подходящие протеолитические ферменты будут известны специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, протеазу Glu-C, протеазу Lys-N, протеазу Lys-C, протеазу Asp-N или химотрипсин.

[00072] Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению стандартная кривая может быть получена с применением способа, включающего: (a) приготовление по меньшей мере двух стандартов концентрации C1q путем смешивания известных количеств очищенного белка C1q и сыворотки, истощенной по C1q; (b) добавление к указанным по меньшей мере двум стандартам концентрации C1q по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, который, как ожидается, будет получен после приведения стандарта концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом; (c) приведение по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q; (d) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций для определения интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, и интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному меченому синтетическому пептидному фрагменту, в каждом из по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q; и (e) определение стандартной кривой с использованием сигналов и известных количеств белка C1q.

[00073] Согласно некоторым аспектам стандартная кривая может быть получена с использованием по меньшей мере трех или по меньшей мере четырех, или по меньшей мере пяти, или по меньшей мере шести, или по меньшей мере семи, или по меньшей мере восьми, или по меньшей мере девяти, или по меньшей мере десяти стандартов концентрации C1q. Согласно некоторым аспектам приготовление стандарта концентрации

C1q может включать разведение, или последовательное разведение, очищенного белка C1q в сыворотке, истощенной по C1q, причем коэффициент разведения может составлять 1:1, 1:1,5 или 1:2, или 1:2,5, или 1:3, или 1:3,5, или 1:4, или 1:5, или 1:6, или 1:7, или 1:8, или 1:9, или 1:10, или 1:100, или 1:1000, или любой коэффициент разведения в диапазоне от 1:1 до 1:10000.

[00074] Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению по меньшей мере один меченый синтетический пептидный фрагмент может быть добавлен к биологическому образцу до приведения биологического образца в контакт с протеолитическим ферментом.

[00075] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения по меньшей мере один меченый синтетический пептидный фрагмент можно применять для устранения проблем способов согласно настоящему изобретению.

[00076] Согласно некоторым аспектам настоящего изобретения сигнал, который соответствует по меньшей мере одному меченому синтетическому пептидному фрагменту, можно применять для нормирования сигнала по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, которому соответствует меченый синтетический пептидный фрагмент.

[00077] Согласно некоторым аспектам способов согласно настоящему изобретению стандартную кривую C1q можно применять для измерения содержания C1q в биологических образцах. Можно установить содержание пептидов C1q в заранее определенных стандартных образцах, а результаты сравнить с результатами ЖХ-МВР-МС для соответствующего пептида C1q, обнаруженного в биологическом образце. Это позволяет рассчитать содержание пептида в биологическом образце. Таким образом, зная содержание пептида в образце, определяют содержание белка, которому он соответствует.

[00078] Композиции согласно настоящему изобретению

[00079] В настоящей заявке подробно описаны различные композиции согласно настоящему изобретению.

[00080] Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, причем указанная композиция содержит по меньшей мере один выделенный синтетический пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из белка C1q.

[00081] Синтетические пептиды могут быть получены с применением любого способа, известного в данной области техники. Эти способы могут включать методики рекомбинантной экспрессии, такие как экспрессия в бактериях или экспрессия *in vitro* в лизате эукариотических клеток. Эти способы также могут включать твердофазный синтез.

[00082] Синтетические пептиды могут быть помечены изотопами. Изотопы, которыми они могут быть помечены, включают C^{13} , H^2 , N^{15} и O^{18} . Меченый пептид может содержать по меньшей мере один C^{13} -меченый и/или N^{15} -меченый остаток лизина или по меньшей мере один C^{13} -меченый и/или N^{15} -меченый остаток аргинина. Пептиды также

могут включать полярный растворитель. Полярные растворители могут включать воду и смеси этанола и воды.

[00083] Согласно некоторым аспектам композиций согласно настоящему изобретению белок C1q может представлять собой белок C1q человека. Согласно другим аспектам белок C1q представляет собой белок C1q *Macaca fascicularis*. Согласно другому аспекту белок C1q может представлять собой белок *Macaca mulatta*. Белок C1q может содержать любую из последовательностей, показанных в таблице 1.

[00084] Согласно некоторым аспектам композиции согласно настоящему изобретению по меньшей мере один выделенный синтетический пептид содержит по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 или по меньшей мере 20 аминокислот.

[00085] Согласно некоторым аспектам композиции согласно настоящему изобретению выделенный синтетический пептид содержит последовательность пептидного фрагмента C1q, полученную при приведении C1q в контакт с протеолитическим ферментом. Согласно предпочтительным аспектам протеолитический фермент представляет собой трипсин. Таким образом, в предпочтительных аспектах выделенный синтетический пептид представляет собой триптический пептид C1q.

[00086] Согласно некоторым аспектам композиции согласно настоящему изобретению выделенный синтетический пептид содержит метку. Выделенные синтетические пептиды могут быть помечены изотопами. Изотопы, которыми они могут быть помечены, включают, но не ограничиваются ими, C¹³, H², N¹⁵ и O¹⁸. Пептиды также могут включать полярный растворитель. Полярные растворители могут включать воду, смеси этанола и воды, а также ацетонитрил.

[00087] Согласно некоторым аспектам композиции согласно настоящему изобретению выделенный синтетический пептид содержит пептид, выбранный из таблицы 2. Согласно другим аспектам композиция содержит любые два пептида, описанные в таблице 2. Согласно другим аспектам композиция содержит любые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 19 пептидов, описанных в таблице 2.

[00088] В предпочтительном аспекте композиция согласно настоящему изобретению может содержать по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, содержащий SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Композиция может содержать по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, содержащий по меньшей мере два из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36). Согласно другим аспектам композиция может содержать по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, содержащий каждый из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

[00089] Согласно некоторым аспектам композиций согласно настоящему изобретению цистеин в синтетическом пептиде SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26) может быть модифицирован. Модификация может представлять собой карбамидометилирование.

[00090] Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере одну переходную пару ионов, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну переходную пару ионов белка C1q, при этом указанная по меньшей мере одна переходная пара ионов состоит из иона-предшественника с соответствующим m/z и иона-фрагмента с соответствующим m/z иона.

[00091] Согласно некоторым аспектам композиций согласно настоящему изобретению белок C1q может представлять собой белок C1q человека. Согласно другим аспектам белок C1q представляет собой белок C1q *Macaca fascicularis*. Согласно другому аспекту белок C1q может представлять собой белок *Macaca mulatta*. Белок C1q может содержать любую из последовательностей, показанных в таблице 1.

[00092] Согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая по меньшей мере одну переходную пару ионов, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну переходную пару ионов белка C1q, при этом указанная по меньшей мере одна переходная пара ионов состоит из иона-предшественника с соответствующим m/z и иона-фрагмента с соответствующим m/z иона, и при этом указанная переходная пара ионов выбрана из переходной пары предшественника SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41) 571,8-942,3, переходной пары предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1 и переходной пары предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3.

[00093] Определения

[00094] В настоящей заявке термин « m/z » обозначает отношение массы к заряду иона.

[00095] В настоящей заявке термин «МС/МС» представляет собой тандемную масс-спектрометрию, которая представляет собой тип масс-спектрометрии, включающий несколько этапов массового анализа с некоторой формой фрагментации, происходящей между этапами.

[00096] В настоящей заявке термин «ЖХ-МВР-МС» является сокращением для «мониторинга выбранных реакций» и может использоваться взаимозаменяемо с «ЖХ-МНР-МС» или «ЖХ-МВР-МС/МС».

[00097] ЖХ-МВР-МС представляет собой высокоселективный способ тандемной масс-спектрометрии, который может эффективно отфильтровывать все молекулы и примеси, кроме целевого (ых) аналита (ов). Это особенно предпочтительно, если анализируемый образец представляет собой сложную смесь, которая может содержать несколько изобарических молекул в пределах определенного аналитического окна. В способах ЖХ-МВР-МС может использоваться тройной квадрупольный масс-спектрометр, который, как известно в данной области техники, содержит три набора квадрупольных стержней. Первый этап отбора по массе выполняется в первом наборе квадрупольных

стержней, а селективно прошедшие ионы фрагментируются во втором наборе квадрупольных стержней. Полученные переходные ионы (продукты) передаются в третий набор квадрупольных стержней, с помощью которого выполняют второй этап отбора по массе. Ионы-продукты, прошедшие через третий набор квадрупольных стержней, измеряются детектором, который генерирует сигнал, представляющий количество селективно прошедших ионов-продуктов. Потенциалы RF и DC, приложенные к первому и третьему квадрупольям, настраиваются для отбора (соответственно) ионов-предшественников и ионов-продуктов, значения m/z которых лежат в пределах узких заданных диапазонов. Задав соответствующие переходы (значения m/z ионов-предшественников и ионов-продуктов), пептид, соответствующий целевому белку, может быть измерен с высокой степенью чувствительности и селективности. Отношение сигнал/шум в ЖХ-МВР-МС часто превосходит эксперименты с использованием стандартной тандемной масс-спектрометрии (МС/МС), которые не нацелены селективно (не фильтруют) на определенные аналиты, а скорее направлены на исследование всех аналитов в образце.

[00098] Масс-спектрометрия ЖХ-МВР-МС включает фрагментацию ионов в газовой фазе и осуществляется между различными этапами массового анализа. Существует много способов, используемых для фрагментации ионов, которые могут привести к различным типам фрагментации и, следовательно, к разной информации о структуре и составе молекулы. Переходные ионы, наблюдаемые в спектре ЖХ-МВР-МС, появляются в результате нескольких различных факторов, которые включают, но не ограничиваются ими, первичную последовательность, количество внутренней энергии, способы приложения энергии и состояние заряда. Для обнаружения переходы должны нести хотя бы один заряд. Ион классифицируется как a , b или c , если заряд находится на этапе перехода, включающего исходный N-конец пептида, в то время как ион классифицируется как x , y или z , если заряд находится на этапе перехода, включающего исходный C-конец пептида. Нижний индекс указывает положение остатков при переходе (например, первый пептидный остаток в x_1 от C-конца, второй пептидный остаток в y_2 от C-конца и третий пептидный остаток в z_3 от C-конца и т. д.).

[00099] В общем повторяющемся звене пептида, представленном $-N-C(O)-C-$, ион x и ион a возникают в результате расщепления связи карбонил-углерод (т. е. $C(O)-C$). Ион x представляет собой ацилий-ион, а ион a представляет собой иминий-ион. Ион y и ион b возникают в результате расщепления связи карбонил-азот (т. е. $C(O)-N$, также известной как амидная связь). В этом случае ион y представляет собой ион аммония, а ион b представляет собой ацилий-ион. И наконец, ион z и ион c возникают в результате расщепления связи азот-углерод (т. е. CN). Ион z представляет собой карбокатион, а ион c представляет собой ион аммония.

[000100] Верхние индексы иногда используются для обозначения нейтральных потерь в дополнение к фрагментации остова, например, * используется для потери аммиака и ° используется для потери воды. Помимо протонов, ионы s и ионы u могут

отщеплять дополнительный протон от пептида-предшественника. При ионизации электрораспылением триптические пептиды могут нести более одного заряда.

[000101] Внутренние переходы возникают из-за двойного расщепления остова. Они могут быть образованы при комбинировании расщепления b-типа и y-типа (т. е. расщепления с получением ионов b и y). Ионы, полученные в результате внутреннего расщепления, также могут быть образованы при комбинировании расщепления a-типа и y-типа. Внутренний переход с одной боковой цепью, образованный в результате комбинации расщепления a-типа и y-типа, называется иминий-ионом (иногда также называемым ионом имония или иммониевым ионом). Эти ионы обозначаются однобуквенным кодом для соответствующей аминокислоты.

[000102] Низкоэнергетическая CID (т. е. диссоциация, вызванная столкновением в тройном квадруполье или ионной ловушке) включает фрагментацию пептида, несущего положительный заряд, в первую очередь вдоль его остова, с получением в основном ионов a, b и y.

[000103] Один или более этапов очистки с помощью жидкостной хроматографии (ЖХ) выполняют перед последующим этапом анализа ЖХ-МВР-МС. Стандартный анализ методом ЖХ основан на химических взаимодействиях между компонентами образца и материалами наполнителя колонки, где ламинарный поток образца через колонку является основой для отделения аналита, представляющего интерес, от тестируемого образца. Квалифицированный специалист поймет, что разделение в таких колонках является диффузионным процессом. Для хроматографического разделения образцов доступны различные материалы наполнителей колонок, и выбор соответствующего протокола разделения является эмпирическим процессом, который зависит от характеристик образца, представляющего интерес аналита, присутствующих препятствующих веществ и их характеристик и т. д. Можно применять различные химические соединения наполнителя в зависимости от потребностей (например, структуры, полярности и растворимости очищаемых соединений). В различных аспектах колонки представляют собой полярные, ионообменные (как катионные, так и анионные), с гидрофобными взаимодействиями, фенильные, C-2, C-8, C-18 колонки, с полярным покрытием на пористом полимере или другие, которые доступны коммерчески. Во время хроматографии на разделение материалов влияют такие переменные как выбор элюента (также известного как «подвижная фаза»), выбор градиентного элюирования и условий градиента, температуры и т. д. Согласно определенным аспектам аналит может быть очищен путем внесения образца в колонку в условиях, при которых представляющий интерес аналит обратимо удерживается материалом наполнителя колонки, в то время как один или более других материалов не удерживаются. В этих аспектах можно применять первое условие подвижной фазы, при котором представляющий интерес аналит удерживается колонкой, и впоследствии можно применять второе условие подвижной фазы для удаления удерживаемого материала из колонки, поскольку не удерживаемые материалы вымываются из колонки. В качестве альтернативы, аналит может быть очищен путем

внесения образца в колонку в условиях подвижной фазы, при которых представляющий интерес анализ элюируется с разной скоростью по сравнению с одним или более другими материалами. Как обсуждалось выше, такие процедуры могут увеличить количество одного или более представляющих интерес аналитов по сравнению с одним или более другими компонентами образца.

[000104] Следующие параметры используют для установления условий ЖХ-МВР-МС анализа белка в конкретной системе ЖХ-МВР-МС: (1) триптический пептид белка; (2) время удерживания (RT) пептида; (3) значение m/z иона-предшественника пептида; (4) потенциал декластеризации, используемый для ионизации иона-предшественника; (5) значение m/z иона-фрагмента, полученного из иона-предшественника пептида; и (6) энергия столкновения (CE), используемая для фрагментации иона-предшественника пептида, которая оптимизирована для конкретного пептида.

[000105] В настоящей заявке термин «ISP» относится к «пептидам внутреннего стандарта».

[000106] Чтобы облегчить точную количественную оценку пептидных переходов с помощью способов, раскрытых в настоящей заявке, набор меченых изотопами синтетических вариантов пептидов, представляющих интерес, может быть добавлен в известных количествах к образцу для использования в качестве внутренних стандартов. Поскольку меченые изотопами пептиды имеют физические и химические свойства, идентичные соответствующему суррогатному пептиду, они совместно элюируются из хроматографической колонки и легко идентифицируются по полученному масс-спектру. Добавление меченых стандартов может происходить до или после протеолитического расщепления. Способы синтеза меченых изотопами пептидов будут известны специалистам в данной области техники. Таким образом, в некоторых аспектах экспериментальные образцы содержат пептиды внутреннего стандарта. Согласно другим аспектам для количественной оценки пептидов можно применять внешние стандарты или другие вспомогательные средства.

[000107] В настоящей заявке термин «триптический пептид» относится к пептиду, который образуется в результате обработки белка трипсином.

[000108] В настоящей заявке термин «стандартная кривая» может использоваться взаимозаменяемо с термином «калибровочная кривая».

[000109] В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа (соответственно, «a», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) включают множественное число объектов, если контекст явно не указывает иное.

[000110] Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, в настоящей заявке термин «или» следует понимать, как включающий и охватывающий как «или», так и «и».

[000111] Если конкретно не указано или не очевидно из контекста, в настоящей заявке термин «примерно» следует понимать, как в пределах диапазона нормального допуска в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от

среднего. «Примерно» можно понимать, как в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от указанного значения. Если иное не ясно из контекста, все числовые значения, представленные в настоящей заявке, модифицированы термином «примерно».

[000112] Если не указано иное, все технические и научные термины используются в настоящей заявке в значении, соответствующем обычному пониманию специалиста в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что при реализации настоящего изобретения можно использовать другие зонды, композиции, способы и наборы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, в настоящей заявке описаны предпочтительные материалы и способы. Следует понимать, что используемая в настоящей заявке терминология предназначена только для цели описания конкретных аспектов и не предназначена для ограничения.

Примеры:

[000113] Пример 1 - Определение стандартной кривой концентрации C1q с применением способов согласно настоящему изобретению

[000114] Способы согласно настоящему изобретению применяли для получения стандартных кривых, также называемых калибровочными кривыми, с использованием набора эталонных растворов C1q с известными концентрациями C1q, включая стандарт C1q и образцы для контроля качества (QC). Также тестировали чувствительность и точность способов согласно настоящему изобретению.

[000115] Калибровочные кривые получали с использованием стандартных образцов C1q, которые готовили и применяли в соответствии со следующими рекомендациями:

Очищенный белок C1q разводили в том же биологическом матриксе, что и экспериментальные образцы,

Набор протестированных эталонных растворов C1q состоял из двойного контроля, контроля и по меньшей мере 6 ненулевых концентраций C1q;

Нижний предел количественного определения (LLOQ) определяется как концентрация белка C1q, при которой измеренный ответ образца LLOQ по меньшей мере в 5 раз превышает ответ контрольного образца так, что точность находится в пределах 25% от номинальной концентрации и коэффициент вариации составляет менее 25%;

Верхний предел количественного определения (ULOQ) определяется таким образом, чтобы точность находилась в пределах 20% от номинальной концентрации, а коэффициент вариации составлял менее 20%.

[000116] Калибровочные кривые получали с использованием образцов C1q QC, которые готовили и применяли в соответствии со следующими рекомендациями:

Для калибровки готовили и использовали по меньшей мере 3 концентрации образцов QC;

Каждый образец QC готовили с двумя повторами;

Образцы QC охватывали низкий, средний и высокий диапазон количественного определения анализа, а образец с низким содержанием аналита для QC (LQC) был в пределах 3-кратной концентрации LLOQ;

Точность по меньшей мере 67% образцов QC была в пределах 20% от номинальной концентрации;

Точность по меньшей мере 50% образцов QC на каждом уровне была в пределах 20% от номинальной концентрации;

Минимальное количество образцов QC было равно или превышало по меньшей мере 5% от количества неизвестных образцов или 6 общих образцов QC;

Образцы QC были приготовлены с маточным раствором C1q, который был независим от маточного раствора для приготовления эталонных растворов C1q.

[000117] Материалы:

Очищенный белок комплемента человека C1q (Quidel, товар № A400)

Сыворотка, истощенная по C1q комплемента, человеческая (Sigma-Aldrich, № по каталогу 234401-1ML)

SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41) (New England Peptide)

IAFSATR (SEQ ID NO: 29) (New England Peptide)

QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) (New England Peptide)

Биспецифичное моноклональное антитело в качестве лекарственного средства-кандидата

Модифицированный трипсин категории для секвенирования, поставляемый с буфером для ресуспендирования (Promega, № по каталогу V5117)

Ультрачистый 1,0 М трис-HCl pH=7,5 (Invitrogen, № по каталогу 15567-027)

Ультрачистый 1,0 М трис-HCl pH=8,0 (Invitrogen, № по каталогу 15568-025)

Ультрачистый 1,0 М трис-HCl pH=8,5 (Alfa Aesar, № по каталогу J61038)

Мочевина (Sigma Aldrich, № по каталогу U5128-100G)

TCEP HCL (Thermo Scientific; № по каталогу 20491)

Йодацетамид (Sigma-Aldrich; № по каталогу A3221-10VL)

Муравьиная кислота (Thermo Scientific; № по каталогу 28905)

Ацетонитрил (Fisher Chemical, № по каталогу A955-4)

Колонка ACQUITY UPLC VEN130 C18, 1,7 мкм, 2,1 мм×50 мм (Waters, деталь № 1860035554)

96-луночный планшет, 0,5 мл, полипропилен (Agilent, деталь № 5042-1386)

Одноразовый 25 мл резервуар для реагентов (VistaLab, деталь № 3054-1004)

Масс-спектрометр TripleQuad (Agilent, модель № 6495)

Система ЖХ 1290 Infinity II (Agilent, модель № 1290)

[000118] Приготовление образца

[000119] 200 мкг/мл маточный раствор C1q готовили в сыворотке человека, истощенной по C1q, и аналитическом буфере для разведения (ADB), содержащем 20 мкг/мл биспецифичного моноклонального антитела в качестве лекарственного средства-

кандидата. Маточный раствор С1q последовательно разводили в соотношении 1:3, шесть раз, чтобы приготовить шесть стандартных растворов С1q (L6-L1). Образцы для LLOQ (нижнего предела количественного определения), образцы с низким содержанием аналита для QC (LQC), образцы со средним содержанием аналита для QC (MQC), образцы с высоким содержанием аналита для QC (HQC) и образцы для ULOQ (верхнего предела количественного определения) готовили в ADB независимо от маточного раствора С1q. Аликвоту ADB резервировали как образец L0 (контрольный). Концентрации стандарта С1q и растворов QC приведены в таблице 3.

[000120] **Таблица 3. Концентрации стандарта С1q и растворов QC.**

Уровень/QC	Концентрация (мкг/мл)
L1/LLOQ	0,27
L2	0,82
L3	2,47
L4	7,41
L5	22,22
L6/ULOQ	66,67
LQC	0,78
MQC	6,25
HQC	50

[000121] Следующие меченые изотопами пептиды внутреннего стандарта (ISP) восстанавливали до 6-12 мМ в 30% ацетонитриле в 0,1% муравьиной кислоте, чтобы получить меченые изотопами растворы ISP: SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

[000122] Каждый образец С1q разводили в 50 раз в 100 мМ трис-НСl, pH=7,5 и 20 мкг/мл биспецифичного антитела. Затем 5 мкл каждого разведенного образца С1q денатурировали и восстанавливали в 20 мкл 8 М мочевины и 10 мМ трис-(2-карбоксиитил)фосфина (ТСЕР) при 56°C и встряхивании в течение 30 минут. После этого к каждому образцу добавляли 5 мкл 50 мМ йодацетамида, а затем образцы инкубировали в темноте при 25°C и встряхивании в течение 30 минут. Затем к каждому образцу добавляли 10 мкл соответствующего раствора ISP, меченого изотопом. После добавления ISP к каждому образцу также добавляли 100 мкл 0,01 мкг/мкл трипсина. Затем образцы инкубировали при 37°C в темноте при встряхивании в течение 4 часов. К образцам добавляли 5 мкл 20% муравьиной кислоты, чтобы нейтрализовать реакцию триптического расщепления. Образцы смешивали и центрифугировали при 4680 об./мин в течение 5 минут перед анализом с помощью ЖХ-МВР-МС/МС.

[000123] *Анализ ЖХ-МВР-МС*

[000124] Анализ ЖХ-МВР-МС выполняли на масс-спектрометре TripleQuad (Agilent, модель № 6495) с системой для ЖХ 1290 Infinity II (Agilent, модель №1290).

Использованный градиент для ЖХ описан в таблице 4, при этом буфер А состоял из 0,1% муравьиной кислоты в воде, а буфер В состоял из 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

[000125] **Таблица 4. Градиент для ЖХ**

Время (минуты)	Буфер А (%)	Буфер В (%)	Поток (мл/минуту)
0,5	97	3	0,4
8,0	75	25	0,4
8,1	10	90	0,4
10,5	10	90	0,4
10,6	97	3	0,4
13,0	97	3	0,4

[000126] Анализ МВР-МС позволял осуществлять одновременный мониторинг нативных пептидных фрагментов С1q и меченых изотопами пептидов в образцах. Площади пиков для двух переходов (нативный и с тяжелой меткой) получали и регистрировали как для нативных, так и для меченых изотопами пептидов С1q. Для каждого стандарта С1q и образцов QC выходные данные для белка С1q, проанализированные с помощью ЖХ-МВР-МС, привели к получению шести измерений, состоящих из измерений двух переходов (нативный и с тяжелой меткой) для каждого из трех отобранных пептидов, представленных в таблице 5 ниже.

[000127] **Таблица 5. Переход m/z и энергия столкновения целевых пептидов С1q.**

Субъединица С1q	Последовательность пептида	SEQ ID NO	Переход m/z	Энергия столкновения (В)
А	SLGFC(Cam)DTTNK	41	571,8 > 942,3	18
В	IAFSATR	29	383,1 > 581,1	10
С	QTHQPPAPNSLIR	36	487,0 > 350,3	13

[000128] Каждый из трех пептидов в таблице 5 происходит из различной субъединицы С1q. Пептидный фрагмент, происходящий из субъединицы В, использовали в качестве пептида для количественного определения (называемого в настоящей заявке пептидом субъединицы В), а пептидные фрагменты, происходящие из субъединиц А (называемые в настоящей заявке пептидом субъединицы А) и С (называемые в настоящей заявке пептидом субъединицы С) использовали в качестве подтверждающих пептидов. Меченые изотопами ISP имеют аминокислотные последовательности, которые идентичны каждому из трех отобранных пептидов, и называются в настоящей заявке меченым изотопом контрольным пептидом субъединицы А, меченым изотопом контрольным пептидом субъединицы В и меченым изотопом контрольным пептидом субъединицы С.

[000129] Три пептида, перечисленные в таблице 5, отбирали на основе предыдущих результатов, которые показали, что эти пептиды представляли собой наилучшие пептиды

для количественного определения концентрации C1q в анализе ЖХ-МВР-МС/МС. Отбор этих пептидов был частично основан на консервативности пептидной последовательности между человеком и обезьяной (*Macaca fascicularis*). На Фигуре 1 показано выравнивание последовательностей субъединицы А C1q человека, обезьяны (*Macaca fascicularis*), мыши и крысы, с выделением пептида субъединицы А. На Фигуре 2 показано выравнивание последовательностей субъединицы В C1q человека, обезьяны (*Macaca fascicularis*), мыши и крысы, с выделением пептида субъединицы В. На Фигуре 3 показано выравнивание последовательностей субъединицы С C1q человека, обезьяны (*Macaca fascicularis*), мыши и крысы, с выделением пептида субъединицы С. Первоначально тестировали несколько триптических пептидов из каждой из субъединиц А, В и С C1q. Протестированные пептиды перечислены в таблице 2.

[000130] *Результаты*

[000131] Каждый стандартный образец C1q и каждый образец C1q QC анализировали с использованием ЖХ-МВР-МС/МС. Для каждого образца регистрировали 6 сигналов: сигнал, соответствующий нативному пептиду субъединицы А, сигнал, соответствующий нативному пептиду субъединицы В, сигнал, соответствующий нативному пептиду субъединицы С, сигнал, соответствующий меченому изотопом контрольному пептиду субъединицы А, сигнал, соответствующий меченому изотопом контрольному пептиду субъединицы В, и сигнал, соответствующий меченому изотопом контрольному пептиду субъединицы С. Данные для меченых изотопами пептидов использовали в качестве внутренних контролей с целью устранения проблем с рабочими характеристиками анализа.

[000132] Для каждого из трех отобранных пептидов (пептид субъединицы А, пептид субъединицы В и пептид субъединицы С) калибровочную кривую получали путем построения графика зависимости нормированного сигнала ЖХ-МВР-МС, зарегистрированного для стандартных образцов C1q, от соответствующих номинальных концентраций этих образцов. На Фигуре 4 показана калибровочная кривая, полученная с использованием сигнала, соответствующего пептиду субъединицы А. На Фигуре 5 показана калибровочная кривая, полученная с использованием сигнала, соответствующего пептиду субъединицы В. На Фигуре 6 показана калибровочная кривая, полученная с использованием сигнала, соответствующего пептиду субъединицы С. На Фигурах 4-6 черные точки представляют стандартные образцы C1q при концентрациях L1-L6. Синие треугольники представляют образцы C1q QC при концентрациях LLOQ, LQC, MQC, HQC и ULOQ.

[000133] Далее после получения калибровочной кривой определяли концентрации образцов QC путем сравнения сигнала ЖХ-МВР-МС/МС каждого из трех целевых пептидов в образцах QC с соответствующей калибровочной кривой. Точность анализа оценивали путем сравнения определенных концентраций с номинальными концентрациями образцов QC. Результаты сравнения представлены в таблицах 6-8.

[000134] Таблица 6. Точность анализа с использованием целевого пептида **SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41)**, происходящего из субъединицы **A C1q**.

Стандарты	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,82	2,47	7,41	22,22	66,67
Точность (%)	103	91	104	100	104	99
QC (N=3)	LLOQ	LQC	MQC	HQC	ULOQ	
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,78	6,25	50	66,67	
Точность (%) - набор1	96	99	97	95	97	
Точность (%) - набор2	102	94	100	96	102	
Точность (%) - набор3	71	101	101	97	104	
%RSD (N=3)	19%	4%	2%	1%	4%	

[000135] Таблица 7. Точность анализа с использованием целевого пептида **IAFSATR (SEQ ID NO: 29)**, происходящего из субъединицы **B C1q**.

Стандарт	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,82	2,47	7,41	22,22	66,67
Точность (%)	101	95	106	98	99	100
QC (N=3)	LLOQ	LQC	MQC	HQC	ULOQ	
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,78	6,25	50	66,67	
Точность (%) - набор1	98	95	97	105	96	
Точность (%) - набор2	94	94	100	106	111	
Точность (%) - набор3	99	94	95	109	113	
%RSD (N=3)	3%	1%	3%	2%	9%	

[000136] Таблица 8. Калибровка анализа **C1q** на основе целевого пептида **QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36)**, происходящего из субъединицы **C C1q**.

Стандарт	L1	L2	L3	L4	L5	L6
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,82	2,47	7,41	22,22	66,67
Точность (%)	101	95	103	100	101	100
QC (N=3)	LLOQ	LQC	MQC	HQC	ULOQ	
Номинальная конц. (мкг/мл)	0,27	0,78	6,25	50	66,67	
Точность (%) - набор1	98	98	99	106	99	
Точность (%) - набор2	104	101	103	105	110	

Точность (%) - набор3	93	97	102	107	111	
%RSD (N=3)	6%	2%	2%	1%	6%	

[000137] Эти результаты демонстрируют, что анализ является как точным, так и чувствительным. Они также демонстрируют, что использование пептида IAFSATR (SEQ ID NO: 29), происходящего из субъединицы В С1q, обеспечило наилучшие результаты, поскольку с помощью ЖХ-МВР-МС/МС был зарегистрирован сильный ответ и сигнал не имел фоновых помех.

[000138] *LLOQ и предел обнаружения (LOD)*

[000139] Как показано на левой и средней панелях Фигуры 7, масс-хроматограмма, зарегистрированная при концентрации LLOQ (0,27 мкг/мл) для пептида субъединицы А и пептида субъединицы В, показала незначительные фоновые пики, или их отсутствие, расположенные в той же временной точке сбора данных, что и пики пептида в контрольном образце и образце для двойного контроля. Однако, как показано на правой панели Фигуры 7, масс-хроматограмма, зарегистрированная для пептида субъединицы С, показала фоновые пики в контрольном образце и образце для двойного контроля. Площадь под кривой для фонового пика в контрольном образце составила приблизительно 5% от площади под кривой для пика образца. В целом, как показано на Фигуре 8, отношения сигнал/шум для пептида субъединицы А, пептида субъединицы В и пептида субъединицы С при концентрации LLOQ составили 51, 36, 94, соответственно, а при концентрации предела обнаружения (LOD) составили 7, 9 и 6, соответственно.

[000140] Пример 2 - Тестирование переноса остатка предыдущей пробы прибора для способов согласно настоящему изобретению

[000141] Поскольку способы согласно настоящему изобретению можно применять для выполнения последовательных экспериментов на одном и том же приборе, важно убедиться, что перенос остатка предыдущей пробы не будет препятствовать анализу следующего образца. Измеряли перенос остатка предыдущей пробы прибора при реализации способов согласно настоящему изобретению.

[000142] Сначала регистрировали хроматограмму ЖХ-МВР-МС для образца контрольного гидролизата. Непосредственно после этого на этом же приборе регистрировали масс-хроматограмму образца С1q QC при концентрации ULOQ (66,7 мкг/мл). Наконец, после анализа образца ULOQ на этом же приборе анализировали второй образец контрольного гидролизата. Как показано на Фигуре 9, отсутствовало значительное изменение хроматограмм контрольного гидролиза до или после анализа образца ULOQ для пептида субъединицы А, субъединицы В или субъединицы С. Эти результаты демонстрируют, что перенос остатка предыдущей пробы прибора для способов согласно настоящему изобретению является минимальным.

[000143] Пример 3 - Тестирование устойчивости к лекарственным средствам способов согласно настоящему изобретению

[000144] Чтобы исследовать, препятствует ли присутствие лекарственных антител способам согласно настоящему изобретению, различные концентрации (0, 20 мкг/мл или

2000 мкг/мл) биспецифичного антитела добавляли к эталонным образцам С1q в двойной контрольной (только контрольный матрикс, без внутреннего стандарта; L00) концентрации. Как показано на Фигуре 10, добавление биспецифичного антитела не вызывало каких-либо значительных изменений зарегистрированной масс-хроматограммы.

[000145] Эталонные образцы С1q при концентрациях LQC, MQC и HQC (0,8 мкг/мл, 6,3 мкг/мл и 50,0 мкг/мл, соответственно) инкубировали в отсутствие биспецифичного антитела или с 0 мкг/мл, 20 мкг/мл, 40 мкг/мл или 2000 мкг/мл биспецифичного антитела и анализировали с помощью ЖХ-МВР-МС/МС. Эти концентрации биспецифичного антитела в анализе С1q соответствовали 1 мг/мл, 2 мг/мл или 100 мг/мл биспецифичного антитела в чистой сыворотке. Чтобы соотнести эти концентрации с фармакокинетикой, при введении в дозировке 50 мг/кг, максимальная сывороточная концентрация (C_{max}) биспецифичного антитела б составляет 1,25-1,5 мг/мл. Как показано на Фигуре 11, добавление биспецифичного антитела фактически улучшает выявление сигнала для пептидов субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С. На Фигуре 11 розовый или первый столбик в каждой группе соответствует образцам, инкубированным в отсутствие биспецифичного антитела; желтый или второй столбик в каждой группе соответствует образцам, инкубированным с 20 мкг/мл биспецифичного антитела; зеленый или третий столбик в каждой группе соответствует образцам, инкубированным с 40 мкг/мл биспецифичного антитела; синий или четвертый столбик в каждой группе соответствует образцам, инкубированным с 2000 мкг/мл биспецифичного антитела.

[000146] Пример 4 - Тестирование выявления разведения и линейности разведения способов согласно настоящему изобретению

[000147] Выявление сигнала эндогенного С1q в способах согласно настоящему изобретению также тестировали на образцах, разведенных в различных разбавителях и с различными коэффициентами разведения. Тестируемые разбавители включали 2% истощенную сыворотку человека, инкубированную с 20 мкг/мл биспецифичного антитела, 2% истощенную сыворотку человека, 0,1% БСА и раствор трис-НСl. Эти образцы разводили в 20, 50 и 100 раз, и для анализа разведений использовали ЖХ-МВР-МС/МС. Как показано на Фигуре 12, добавление биспецифичного антитела улучшает выявление сигналов пептидов субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С даже при более высоких коэффициентах разведения. В образцах, разведенных 0,1% БСА и Трис-НСl, выявление сигнала было ниже. На Фигуре 12 синий или первый столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 2% истощенной сывороткой человека, инкубированной с 20 мкг/мл биспецифичного антитела; оранжевый или второй столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 2% истощенной сывороткой человека; зеленый или третий столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 0,1% БСА; фиолетовый или четвертый столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным трис-НСl.

[000148] Также тестировали выявление сигнала от эталонных стандартов С1q с использованием различных разбавителей. Эталонные образцы С1q при концентрациях LQC, MQC и HQC (0,8 мкг/мл, 6,3 мкг/мл и 50,0 мкг/мл, соответственно) разводили либо 2% истощенной сывороткой человека, инкубированной с 20 мкг/мл биспецифичного антитела, 2% истощенной сывороткой человека или 0,1% БСА. Как показано на Фигуре 13, биспецифичное антитело улучшило выявление сигналов пептидов субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С. На Фигуре 13 синий или первый столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 2% истощенной сывороткой человека, инкубированной с 20 мкг/мл биспецифичного антитела; оранжевый или второй столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 2% истощенной сывороткой человека; зеленый или третий столбик в каждой группе соответствует образцам, разведенным 0,1% БСА.

[000149] Для тестирования линейности разведения способов согласно настоящему изобретению объединенные образцы сыворотки человека, самцов обезьян и самок обезьян разводили в 20 раз, 50 раз и 100 раз. Концентрации эндогенного С1q в этих разведенных образцах определяли с применением способов согласно настоящему изобретению. Результаты этого теста показаны в таблице 9 ниже.

[000150] **Таблица 9. Тест линейности разведения с использованием эндогенного С1q.**

Образец	Козф. разведения	По С1Q-A		По С1Q-B		По С1Q-C	
		Рассчитанная конц. (мкг/мл)	% RSD	Рассчитанная конц. (мкг/мл)	% RSD	Рассчитанная конц. (мкг/мл)	% RSD
Объединенная сыворотка человека	100X	89		80		78	
	50X	70	12,4%	72	5,3%	70	6,0%
	20X	87		74		74	
Самец обезьяны	100X	87		59		61	
	50X	81	8,7%	58	0,8%	60	2,7%
	20X	96		58		58	
Самка обезьяны	100X	70		56		55	
	50X	67	2,1%	49	6,2%	50	8,7%
	20X	69		54		59	

[000151] Пример 5 - Воспроизводимость приготовления образца и стабильность образца в способах согласно настоящему изобретению

[000152] Воспроизводимость приготовления образца способами согласно настоящему изобретению тестировали с использованием образцов С1q QC при концентрациях LLOQ, LQC, MQC, HQC и ULOQ. Для тестирования воспроизводимости впрыскивания аликвоты одного и того же образца QC впрыскивали в прибор для анализа

либо в один и тот же день (в пределах суток), либо в разные дни (межсуточный). Для тестирования воспроизводимости приготовления образца образцы готовили из растворов QC либо в один и тот же день (в пределах суток), либо в разные дни (межсуточный). Тестировали 3 образца для каждого условия, и относительное стандартное отклонение 3 образцов для каждого условия показано в таблице 10 ниже.

[000153] **Таблица 10. Воспроизводимость впрыскивания и приготовления образца способов согласно настоящему изобретению**

C1Q	QC (n=3)	% RSD			
		В пределах суток Дозатор	Межсуточный Дозатор	В пределах суток Приготовление образца	Межсуточный Приготовление образца
C1Q-A	LLOQ	0,6	10,2	3,0	14,0
	LQC	7,8	7,1	9,2	13,7
	MQC	1,2	5,4	2,7	4,3
	HQC	1,2	1,3	0,9	1,3
	ULOQ	2,5	2,0	2,0	2,0
C1Q-B	LLOQ	4,8	5,0	0,8	6,0
	LQC	4,4	9,3	2,0	4,6
	MQC	1,8	6,2	1,5	3,9
	HQC	0,5	2,0	1,2	1,8
	ULOQ	0,4	0,8	1,2	1,7
C1Q-C	LLOQ	6,8	6,2	4,6	5,6
	LQC	1,3	1,6	3,3	5,6
	MQC	2,3	2,0	3,2	2,9
	HQC	1,3	2,2	1,6	2,5
	ULOQ	1,0	1,9	1,9	2,7

[000154] Для тестирования стабильности образца образцы C1q QC при концентрациях LLOQ, LQC, MQC, HQC и ULOQ (0,3 мкг/мл, 0,8 мкг/мл, 6,3 мкг/мл, 50,0 мкг/мл и 66,7 мкг/мл, соответственно) подвергали либо трем циклам замораживания-оттаивания, либо хранили в автоматическом пробоотборнике в течение 48 часов до определения в них концентрации C1q с помощью анализа C1q. Как показано на Фигуре 14, три цикла замораживания-оттаивания или 48-часовое хранение в автоматическом пробоотборнике не оказывали существенного влияния на точность способов согласно настоящему изобретению. В верхнем ряду диаграмм на Фигуре 14 первый столбик в

каждой группе соответствует образцам, которые были проанализированы свежими перед замораживанием; второй столбик в каждой группе соответствует образцам, которые были подвергнуты трем циклам замораживания-оттаивания. В нижнем ряду диаграмм на Фигуре 14 первый столбик в каждой группе соответствует образцам, которые были проанализированы свежими; второй столбик в каждой группе соответствует образцам, которые были проанализированы после 48 часов хранения в автоматическом пробоотборнике.

[000155] В отдельных экспериментах также тестировали хранение в течение 72 часов, при этом не наблюдали разрушение или потерю образца.

[000156] Пример 6 - Вариант анализа, относящийся к пептидам внутреннего стандарта в способах согласно настоящему изобретению

[000157] Меченые тяжелыми изотопами пептиды, называемые пептидами внутреннего стандарта (ISP), имеют идентичные аминокислотные последовательности с пептидами субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С. Образцы C1q QC при концентрациях LLOQ, LQC, MQC, HQC и ULOQ (0,3 мкг/мл, 0,8 мкг/мл, 6,3 мкг/мл, 50,0 мкг/мл и 66,7 мкг/мл, соответственно) анализировали в присутствии и в отсутствие каждого ISP. Результаты этого анализа показаны в таблице 11. Включение ISP не препятствовало анализу. Таким образом, меченые изотопами пептиды использовали с целью подтверждения времени удерживания, калибровки рабочих характеристик прибора и устранения проблем.

[000158] **Таблица 11. Варианты анализа C1q с использованием меченых изотопами пептидов внутреннего стандарта или без них**

QC (n=3)	%RSD для QC (n=3)					
	C1QA		C1QB		C1QC	
	- ISP	+ ISP	- ISP	+ ISP	- ISP	+ ISP
LLOQ	8%	12%	4%	2%	2%	8%
LQC	11%	11%	4%	2%	2%	1%
MQC	2%	6%	3%	5%	2%	4%
HQC	2%	6%	1%	4%	0%	8%
ULOQ	2%	3%	1%	1%	2%	7%

[000159] Пример 6 - Количественное определение C1q в образцах крови от обработанных обезьян с применением способов согласно настоящему изобретению

[000160] Способы согласно настоящему изобретению применяли для количественного определения концентрации белка C1q, присутствующего в образцах крови обезьян, получивших биспецифичное антитело. Обозначение групп обезьян и уровни дозы показаны в таблице 12.

[000161] **Таблица 12. Обозначение групп обезьян и уровни дозы**

Группа	Кол-во животных (самцы)	Уровень дозы (мг/кг)	Концентрация дозы (мг/мл)
1 (контроль изотипа)	3	50	25
2 (низкий)	3	2	1
3 (средний)	3	10	5
4 (высокий)	3	50	25

[000162] Группе 1 вводили разведенное антитело для контроля изотипа путем медленной внутривенной болюсной инъекции при объеме дозы 2 мл/кг. Группам 2, 3 и 4 вводили разведенное биспецифичное антитело путем медленной внутривенной болюсной инъекции при дозе 2 мл/кг. Образцы крови объемом 0,5 мл собирали в соответствии со следующим графиком: образец перед введением дозы и образец приблизительно через 5 минут после введения дозы собирали на День 1; последующие образцы собирали через 24 часа, 72 часа и 168 часов после введения дозы; образцы также собирали один раз в каждый из Дня 14 после введения дозы, Дня 42 после введения дозы и Дня 56 после введения дозы. Образцы крови центрифугировали в течение 1 часа после сбора, и собранные образцы сыворотки разделяли на 4 аликвоты по 50 мкл каждая.

[000163] Каждый образец сыворотки обезьяны разводили в 50 раз в 100 мМ Трис-НС1, рН=7,5 и 20 мкг/мл биспецифичного антитела. Затем 5 мкл каждого разведенного образца сыворотки обезьяны денатурировали и восстанавливали в 20 мкл 8 М мочевины и 10 мМ трис-(2-карбокситил)фосфина (ТСЕР) при 56°C и встряхивании в течение 30 минут. После этого к каждому образцу добавляли 5 мкл 50 мМ йодацетамида, и затем образцы инкубировали в темноте при 25°C и встряхивании в течение 30 минут. 10 мкл раствора соответствующего меченого изотопом пептида внутреннего стандарта (см. пример 1) добавляли перед добавлением 100 мкл 0,01 мкг/мкл трипсина к каждому образцу. Затем образцы инкубировали при 37°C в темноте при встряхивании в течение 4 часов. К образцам добавляли 5 мкл 20% муравьиной кислоты, чтобы нейтрализовать реакцию триптического расщепления. Образцы смешивали и центрифугировали при 4680 об./мин в течение 5 минут перед их анализом с помощью ЖХ-МВР-МС/МС.

[000164] Для каждого образца сыворотки обезьяны использовали ЖХ-МВР-МС/МС, чтобы зарегистрировать сигнал, соответствующий пептиду субъединицы А, пептиду субъединицы В и пептиду субъединицы С, а также сигналы, соответствующие меченым изотопами пептидам внутреннего стандарта.

[000165] Затем определяли концентрации С1q в каждом из образцов сыворотки обезьян, получивших дозу, путем сравнения сигналов пептидов субъединицы А, субъединицы В и субъединицы С с калибровочными кривыми (полученными, как описано в примере 1). Концентрации С1q, определенные с помощью пептида субъединицы А, пептида субъединицы В и пептида субъединицы С, показаны в таблицах 13-15. Динамика концентраций С1q в крови обезьян после введения дозы показана на фигурах 15-17. На

Фигуре 15 показана концентрация С1q в образцах обезьян, получивших дозу, определенная количественно с использованием пептида субъединицы А. На Фигуре 16 показана концентрация С1q в образцах обезьян, получивших дозу, определенная количественно с использованием пептида субъединицы В. На Фигуре 17 показана концентрация С1q в образцах обезьян, получивших дозу, определенная количественно с использованием пептида субъединицы С. На Фигуре 15-17 синяя линия соответствует обезьянам в группе 1, красная линия соответствует обезьянам в группе 2, зеленая линия соответствует обезьянам в группе 3, а фиолетовая линия соответствует обезьянам в группе 4.

[000166] **Таблица 13. Количественное определение концентрации С1q в образцах крови обезьян, получивших дозу, с применением целевого пептида SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), происходящего из субъединицы А С1q.**

Временная точка	Концентрация С1q по субъединице А (мкг/мл)											
	Группа 1 (контроль изотипа)			Группа 2 (низкая доза)			Группа 3 (средняя доза)			Группа 4 (высокая доза)		
	P0001	P0002	P0003	P0101	P0102	P0103	P0201	P0202	P0203	P0301	P0302	P0303
До введения дозы	124	87	102	89	93	76	114	120	90	59	92	92
5 мин	102	88	94	78	81	72	90	91	74	43	70	67
24 ч	118	83	108	78	89	74	84	102	66	4*	58	9*
72 ч	112	76	96	80	79	64	93	96	67	5*	53	13*
168 ч	116	80	96	81	86	79	106	106	81	8*	67	28
D14	105	77	99	78	100	70	120	93	79	25	71	63
D42	106	81	96	74	103	80	85	106	91	56	83	99
D56	109	91	96	79	104	74	105	117	92	53	86	94

[000167] *Расчетная концентрация С1q. Концентрация ниже LLOQ (0,27 мкг/мл), но выше LOD (0,027 мкг/мл).

[000168] **Таблица 14. Количественное определение концентрации С1q в образцах крови обезьян, получивших дозу, с применением целевого пептида IAFSATR (SEQ ID NO: 29), происходящего из субъединицы В С1q.**

Временная точка	Концентрация С1q по субъединице В (мкг/мл)											
	Группа 1 (контроль изотипа)			Группа 2 (низкая доза)			Группа 3 (средняя доза)			Группа 4 (высокая доза)		
	P0001	P0002	P0003	P0101	P0102	P0103	P0201	P0202	P0203	P0301	P0302	P0303

До введения дозы	99	72	88	69	79	67	90	93	67	49	75	74
5 мин	82	67	80	61	69	59	71	77	58	34	58	55
24 ч	90	66	82	66	75	62	65	76	51	1*	44	5*
72 ч	90	63	75	59	75	59	72	73	53	2*	44	7*
168 ч	88	67	74	66	77	62	82	81	64	6*	50	19
D14	85	68	75	62	77	66	85	78	63	17	60	49
D42	86	65	76	61	79	67	75	80	69	46	66	76
D56	82	76	82	63	88	68	84	85	74	44	69	73

[000169] *Расчетная концентрация C1q. Концентрация ниже LLOQ (0,27 мкг/мл), но выше LOD (0,027 мкг/мл).

[000170] **Таблица 15. Количественное определение концентрации C1q в образцах крови обезьян, получивших дозу, с применением целевого пептида QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36), происходящего из субъединицы С C1q.**

Временная точка	Концентрация C1q по субъединице С (мкг/мл)											
	Группа 1 (контроль изотипа)			Группа 2 (низкая доза)			Группа 3 (средняя доза)			Группа 4 (высокая доза)		
	P0001	P0002	P0003	P0101	P0102	P0103	P0201	P0202	P0203	P0301	P0302	P0303
До введения дозы	94	66	78	65	73	62	94	88	66	51	41	73
5 мин	76	59	70	53	60	54	68	73	61	37	31	52
24 ч	88	63	76	57	68	58	62	75	51	6*	23	9*
72 ч	87	58	64	57	61	54	69	70	54	7*	24	12*
168 ч	79	62	72	62	69	58	79	81	60	8*	28	22
D14	86	67	73	61	77	59	79	74	62	21	34	48
D42	82	60	73	53	74	62	71	76	66	45	39	77
D56	78	73	78	58	82	62	85	80	74	47	39	75

[000171] *Расчетная концентрация C1q. Концентрация ниже LLOQ (0,27 мкг/мл), но выше LOD (0,027 мкг/мл).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Анализ, включающий:

(1) приведение биологического образца в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента белка C1q, присутствующего в биологическом образце; и

(2) выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций (МВР-МС) для измерения содержания указанного по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q, причем указанное содержание по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q определяет концентрацию C1q в указанном биологическом образце.

2. Анализ по п. 1, также включающий между этапом (1) и этапом (2) добавление к указанному биологическому образцу по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента C1q, содержащего аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности указанного по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q.

3. Анализ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что измерение содержания по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q включает сравнение сигнала, соответствующего по меньшей мере одному пептиду C1q, полученного с помощью МВР-МС, со стандартной кривой.

4. Анализ по п. 3, отличающийся тем, что указанную стандартную кривую получают с применением способа, включающего:

приготовление по меньшей мере двух стандартов концентрации C1q путем смешивания известных количеств очищенного белка C1q и сыворотки, истощенной по C1q;

добавление к указанным по меньшей мере двум стандартам концентрации C1q по меньшей мере одного меченого синтетического пептидного фрагмента с аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, который, как ожидается, будет получен после приведения указанного стандарта концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом;

приведение указанных по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q в контакт с протеолитическим ферментом с получением по меньшей мере одного пептидного фрагмента C1q;

выполнение масс-спектрометрии с мониторингом выбранных реакций для определения интенсивности сигнала, который соответствует указанному по меньшей мере одному пептидному фрагменту C1q, и интенсивности сигнала, который соответствует по меньшей мере одному меченому синтетическому пептидному фрагменту, в каждом из указанных по меньшей мере двух меченых стандартов концентрации C1q; и

определение стандартной кривой с применением указанных сигналов и известных количеств белка C1q.

5. Анализ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный биологический образец представляет собой:

образец крови; и/или

человеческий образец или образец примата, отличного от человека.

6. Анализ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанный по меньшей мере один пептидный фрагмент содержит:

по меньшей мере 5 аминокислот; и/или

пептид, выбранный из таблицы 2; и/или

SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); и/или

по меньшей мере два из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); и/или

каждый из SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) и QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36).

7. Анализ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанная масс-спектрометрия с мониторингом выбранных реакций представляет собой ЖХ-МБР-МС/МС.

8. Композиция, содержащая по меньшей мере один выделенный синтетический пептид, причем указанная композиция содержит по меньшей мере один выделенный синтетический пептид с аминокислотной последовательностью, выбранной из белка C1q, при этом указанная аминокислотная последовательность, выбранная из белка C1q, представляет собой последовательность пептидного фрагмента C1q, полученного при приведении C1q в контакт с по меньшей мере одним протеолитическим ферментом.

9. Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что указанный C1q получен из организма человека или примата, отличного от человека.

10. Композиция по любому из пп. 8-9, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один выделенный синтетический пептид содержит по меньшей мере 5 аминокислот.

11. Анализ по любому из пп. 1-7 или композиция по любому из пп. 8-10, отличающиеся тем, что указанный по меньшей мере один протеолитический фермент представляет собой трипсин.

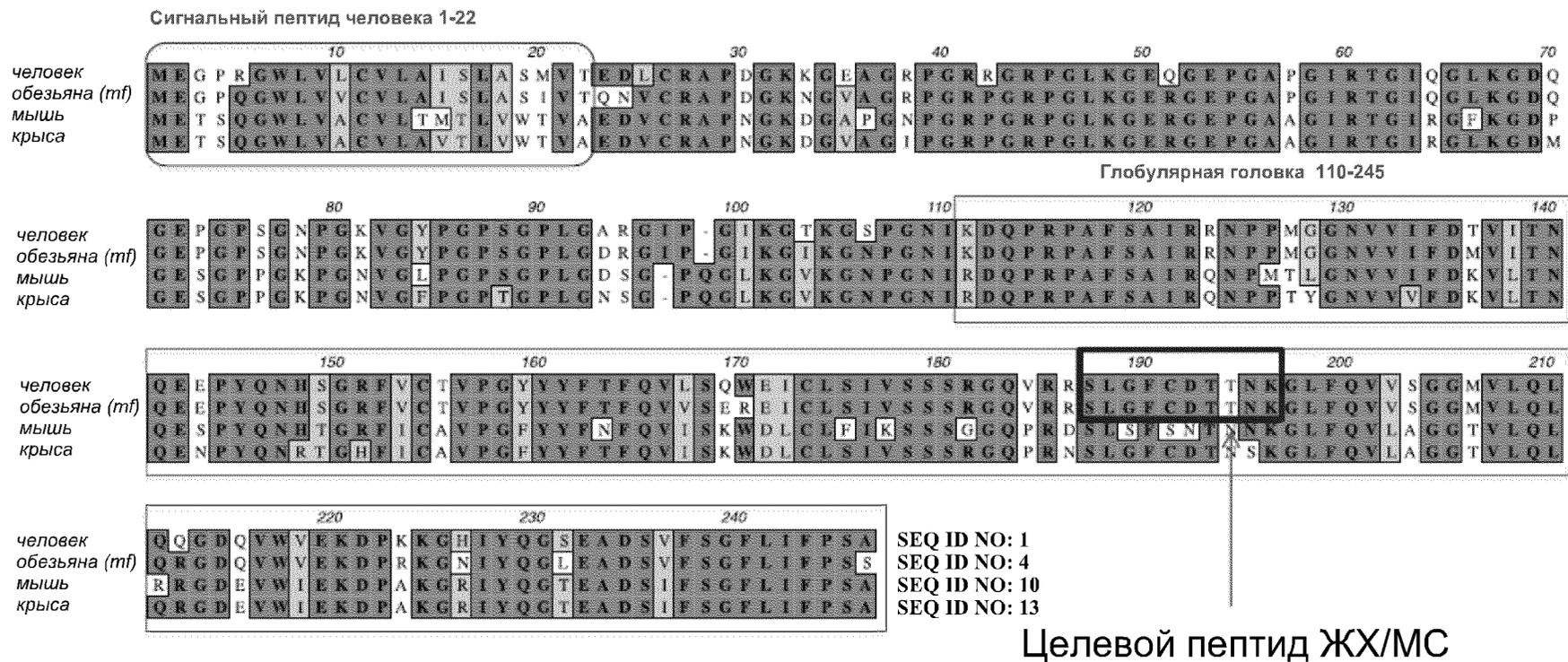
12. Композиция по любому из пп. 8-11, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один выделенный синтетический пептид содержит метку.

13. Композиция по любому из пп. 8-12, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один выделенный синтетический пептид содержит пептид, выбранный из таблицы 2.

14. Композиция по п. 13, отличающаяся тем, что указанный по меньшей мере один выделенный синтетический пептид содержит SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26), IAFSATR (SEQ ID NO: 29) или QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36); при этом необязательно цистеин в указанном синтетическом пептиде SLGFCDTTNK (SEQ ID NO: 26) модифицирован; и при этом необязательно указанный цистеин модифицирован путем карбамидометилирования.

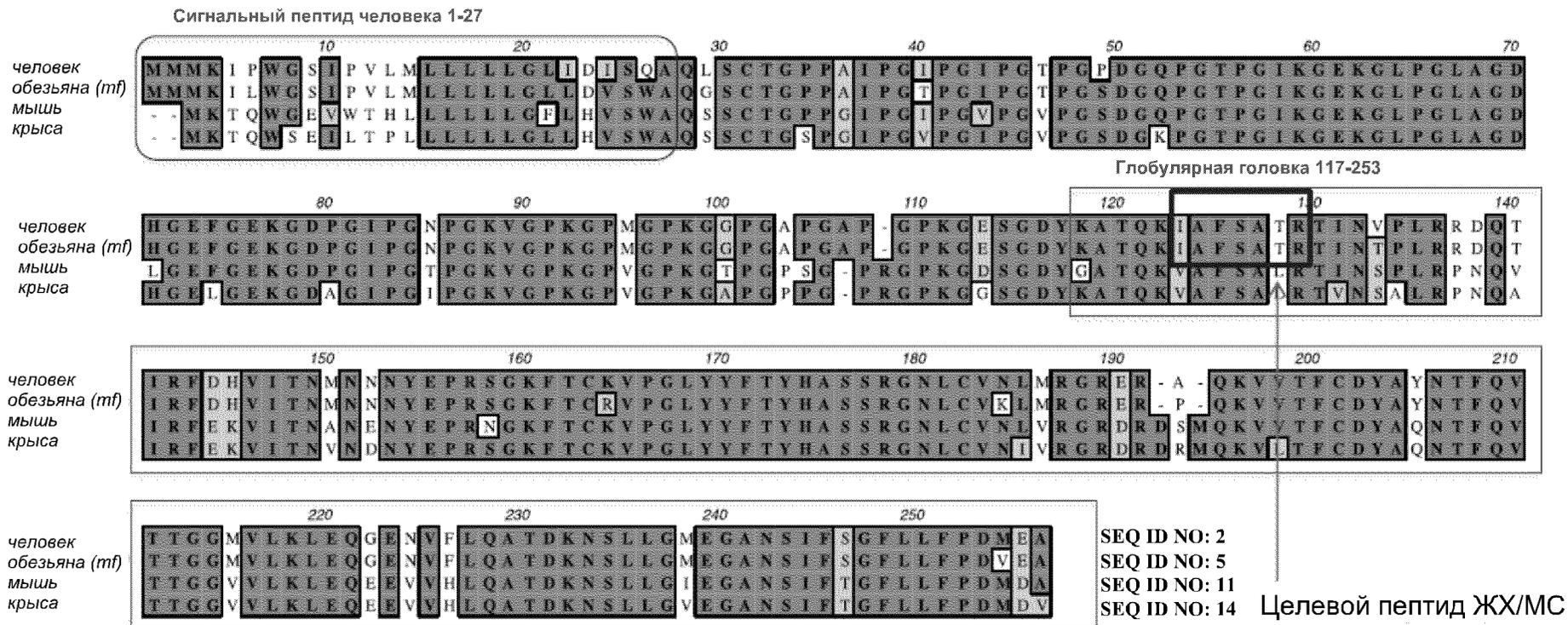
15. Композиция, содержащая по меньшей мере одну переходную пару ионов, причем указанная композиция содержит по меньшей мере одну переходную пару ионов белка C1q, при этом указанная по меньшей мере одна переходная пара ионов состоит из иона-предшественника с соответствующим m/z и иона-фрагмента с соответствующим m/z иона, и при этом указанная переходная пара ионов выбрана из переходной пары предшественника SLGFC(Cam)DTTNK (SEQ ID NO: 41) 571,8-942,3, переходной пары предшественника IAFSATR (SEQ ID NO: 29) 383,1-581,1 и переходной пары предшественника QTHQPPAPNSLIR (SEQ ID NO: 36) 487,0-350,3.

По доверенности



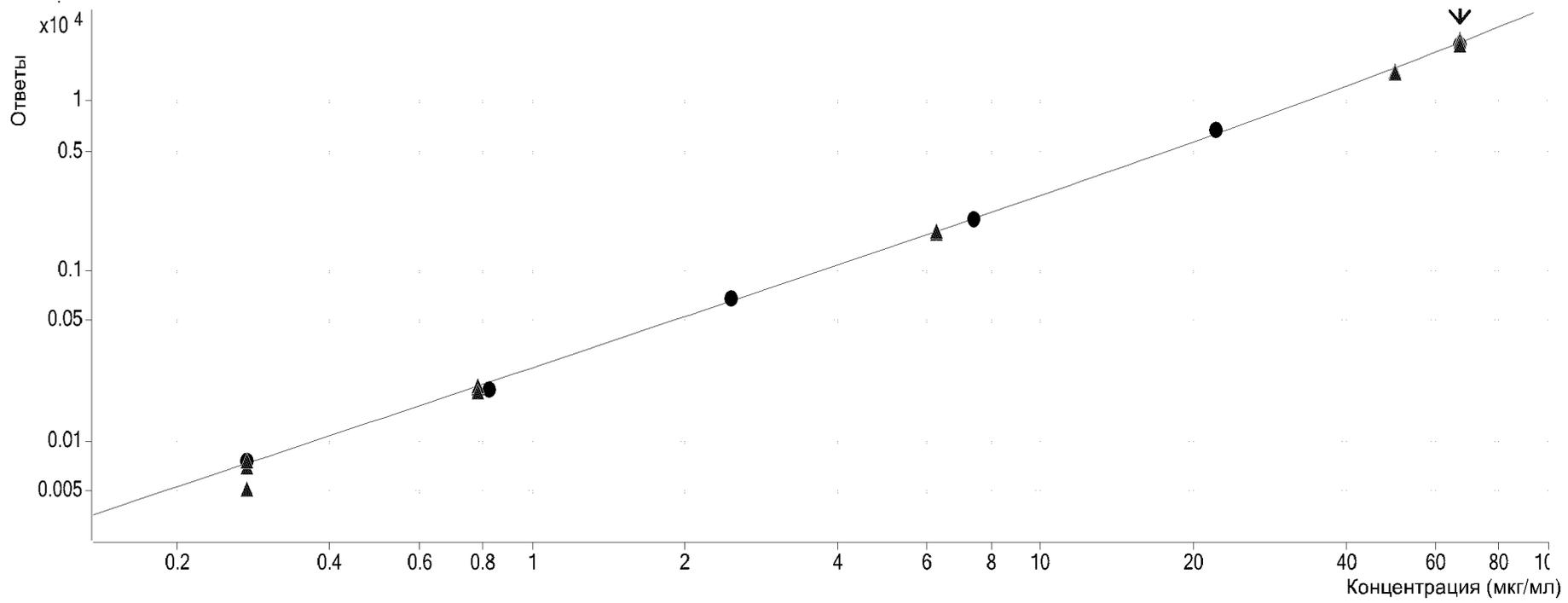
1/17

ФИГ. 1

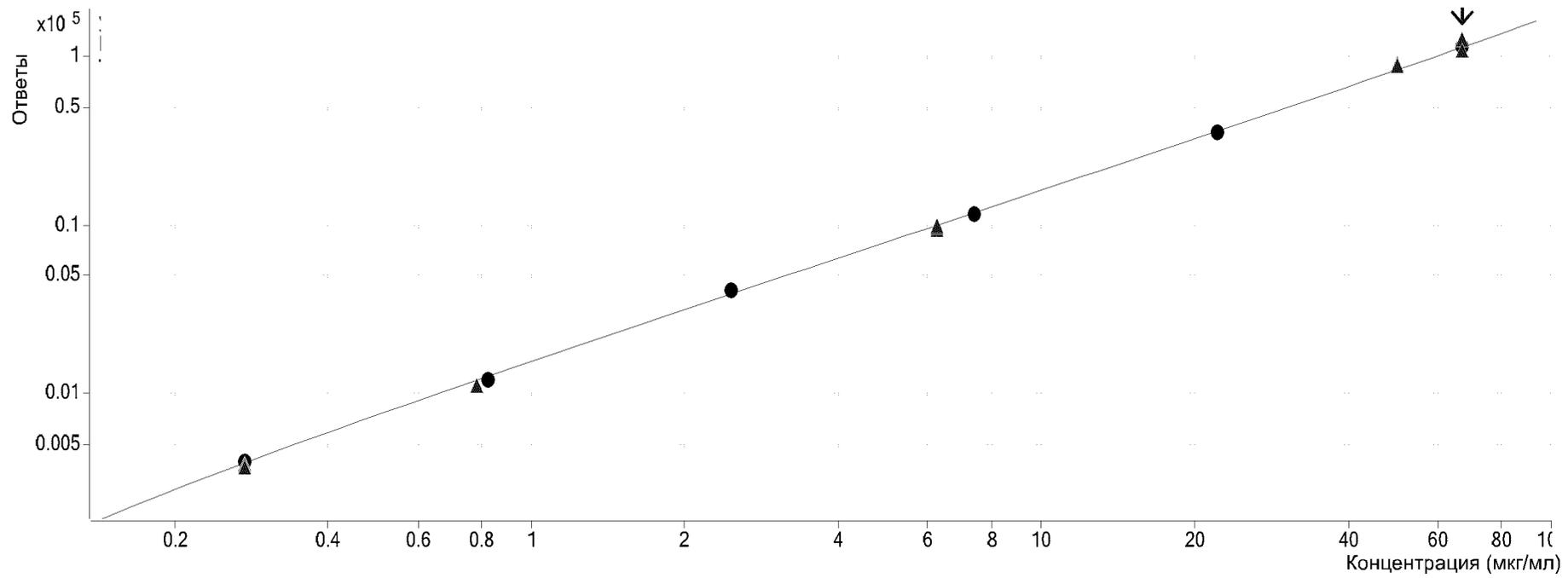


2/17

ФИГ. 2

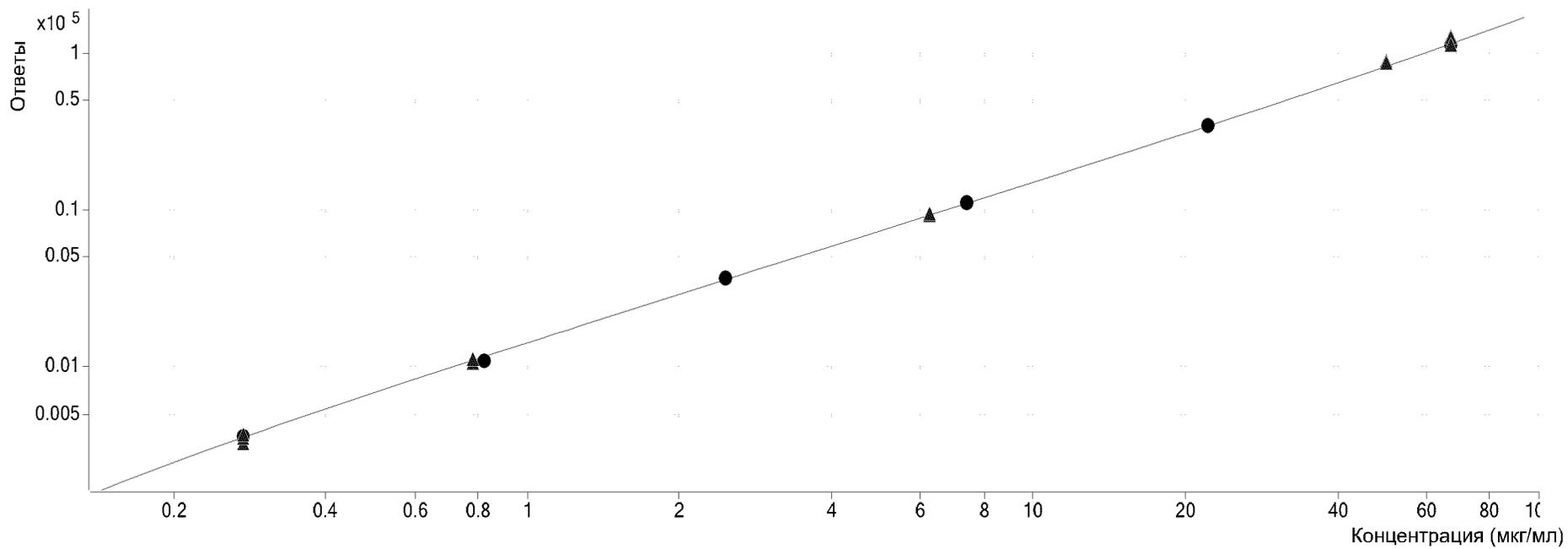


ФИГ. 4



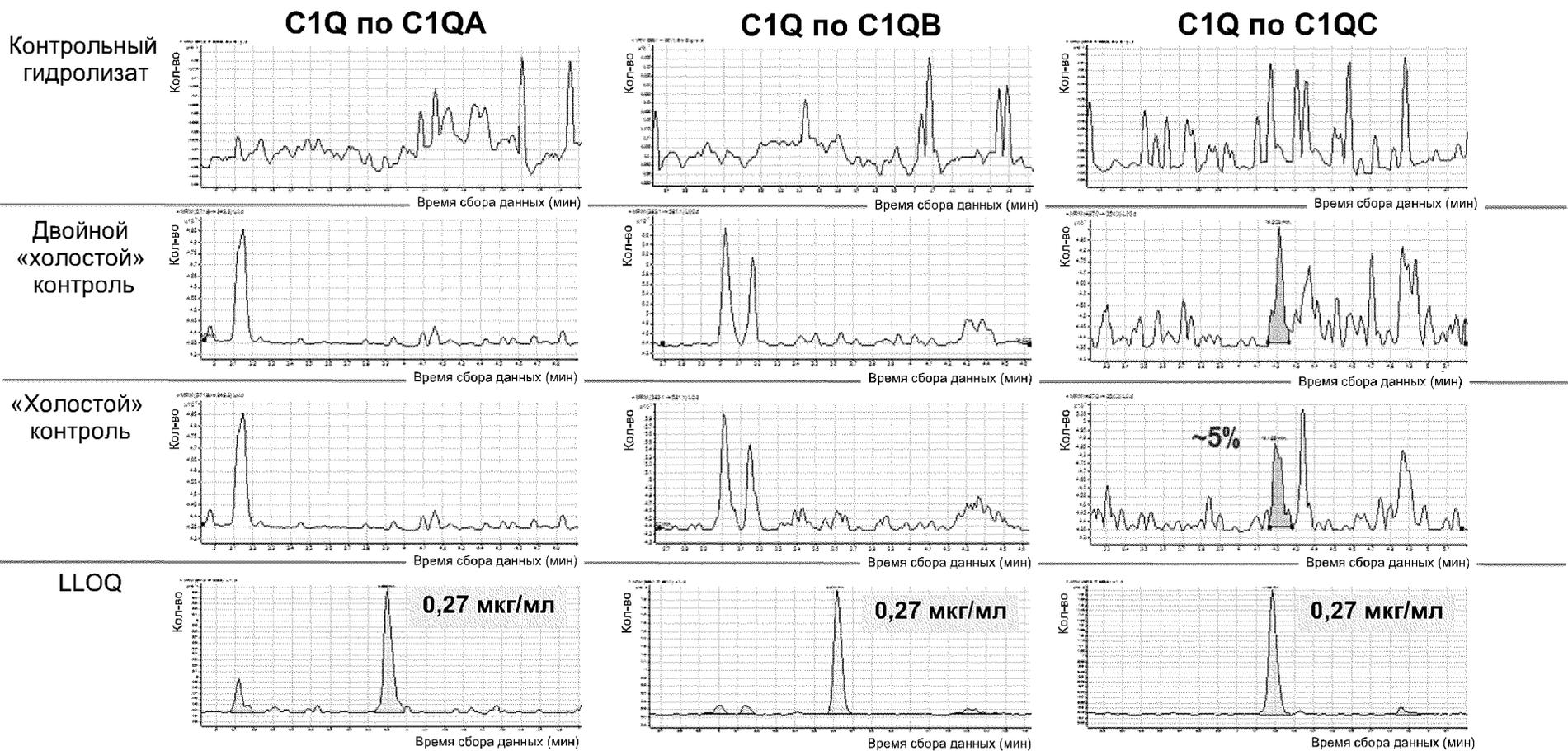
5/17

ФИГ. 5



6/17

ФИГ. 6



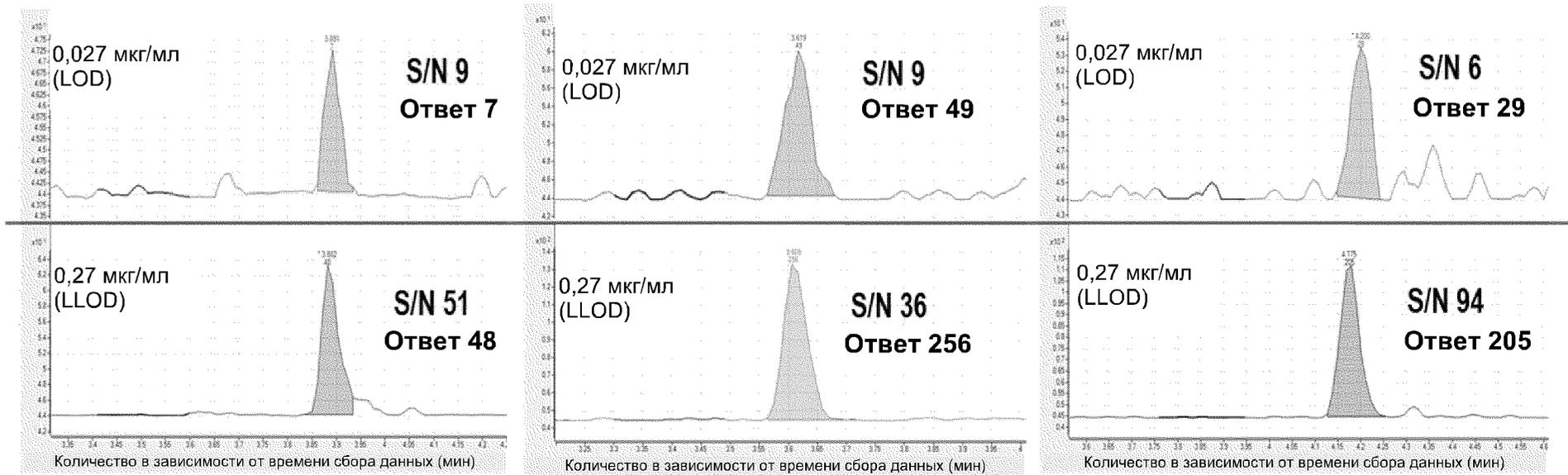
7/17

ФИГ. 7

C1Q по C1Q-A

C1Q по C1Q-B

C1Q по C1Q-C

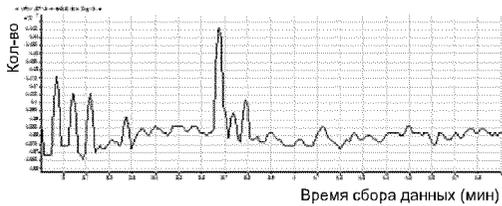


8/17

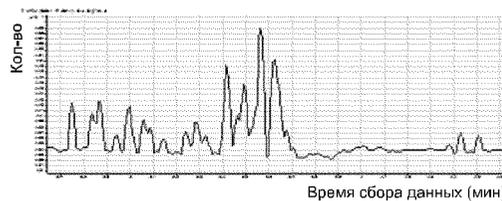
ФИГ. 8

Контрольный гидролизат после

C1Q по C1QA



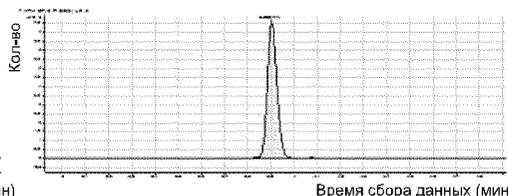
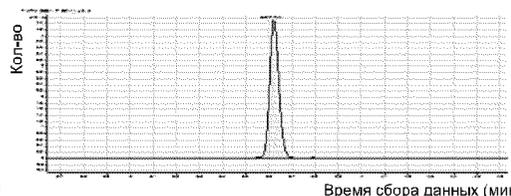
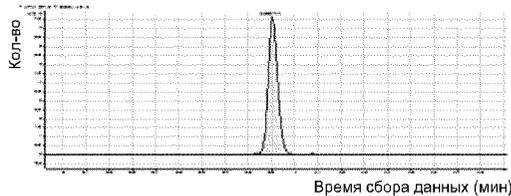
C1Q по C1QB



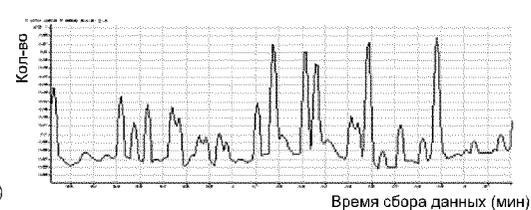
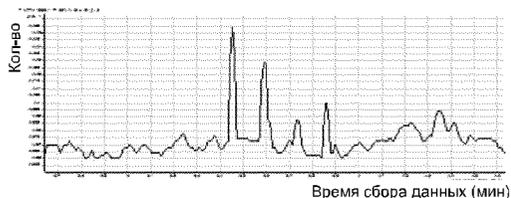
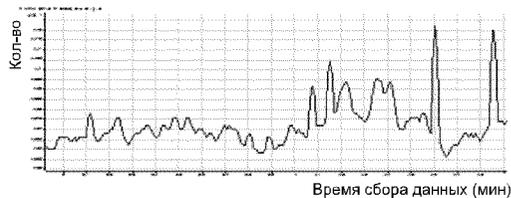
C1Q по C1QC



ULOQ



Контрольный гидролизат до



9/17

ФИГ. 9

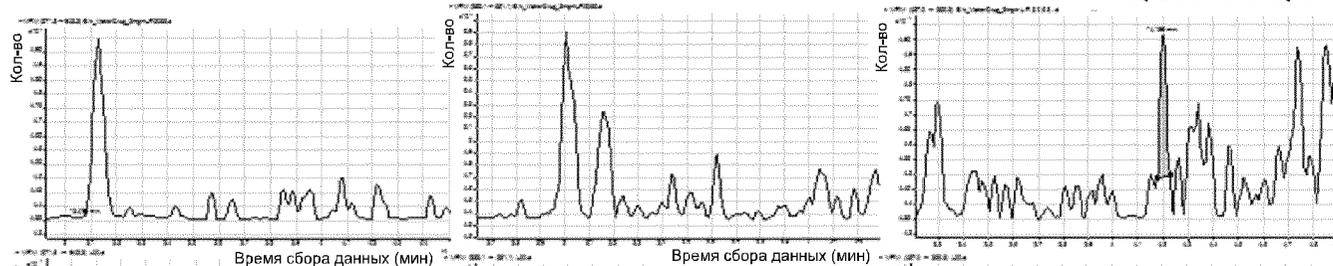
2000 мкг/мл антитела

(L00)

C1Q по C1QA

C1Q по C1QB

C1Q по C1QC



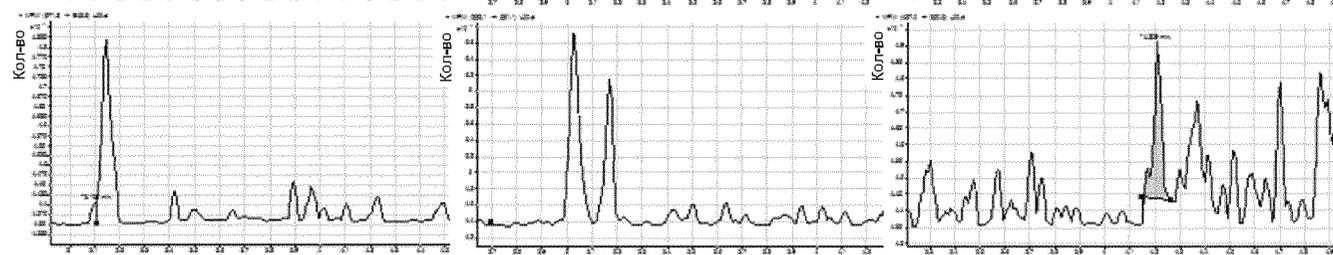
20 мкг/мл антитела

(L00)

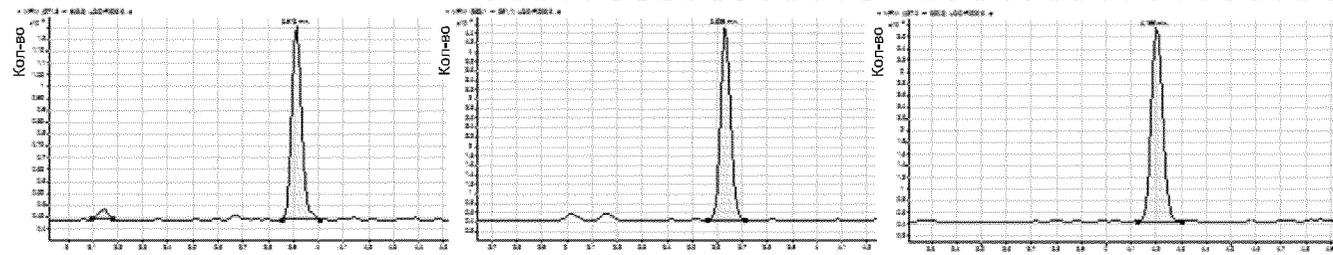


Контроль - без антитела

(L00)

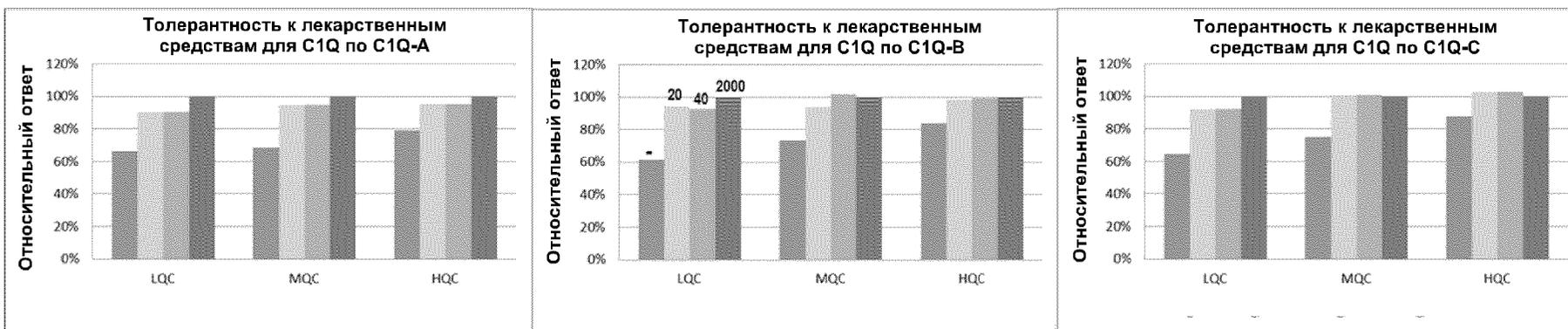


LLOQ

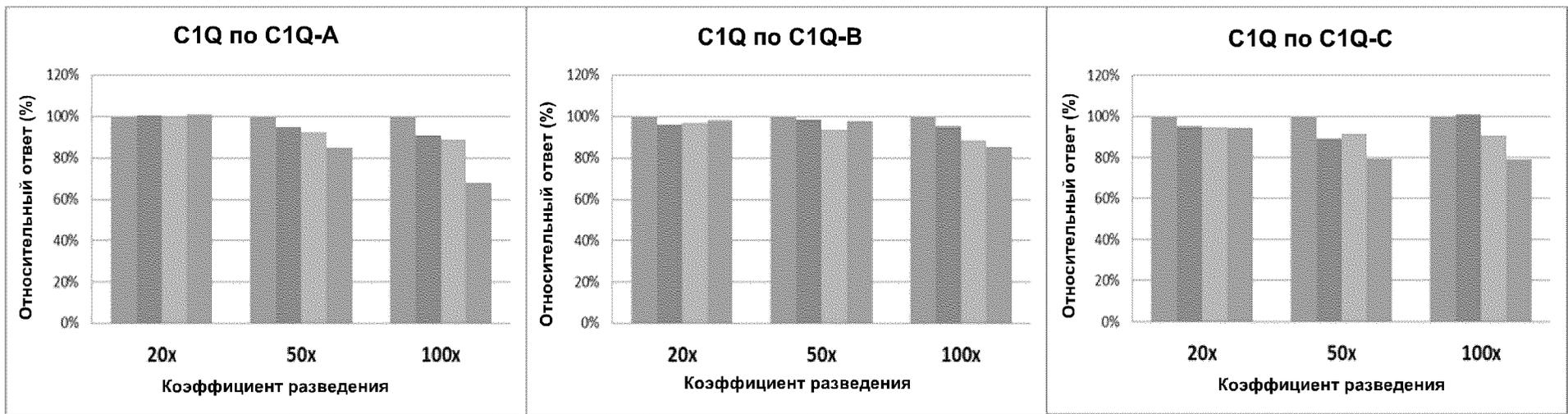


ФИГ. 10

10/17

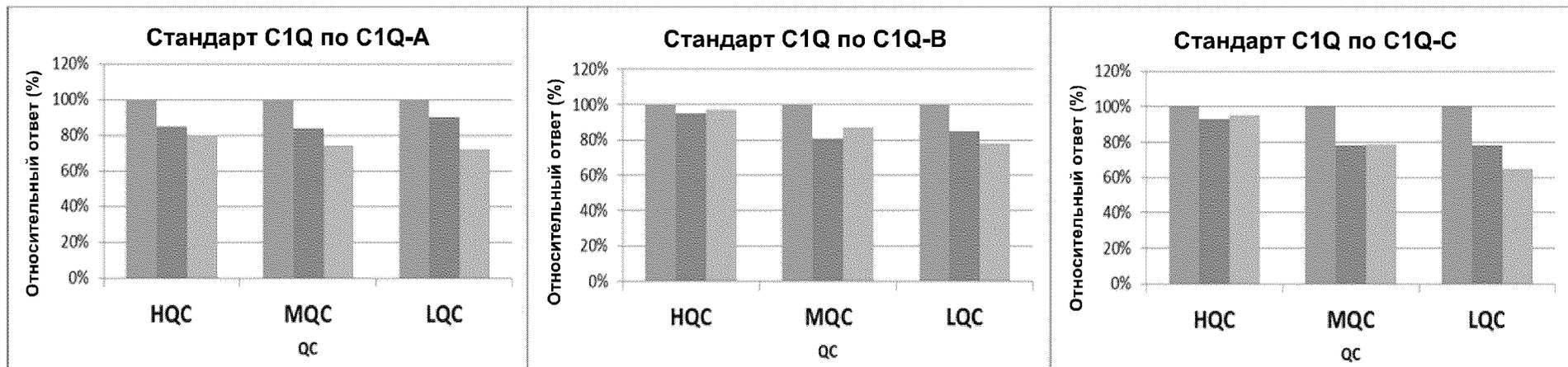


ФИГ. 11

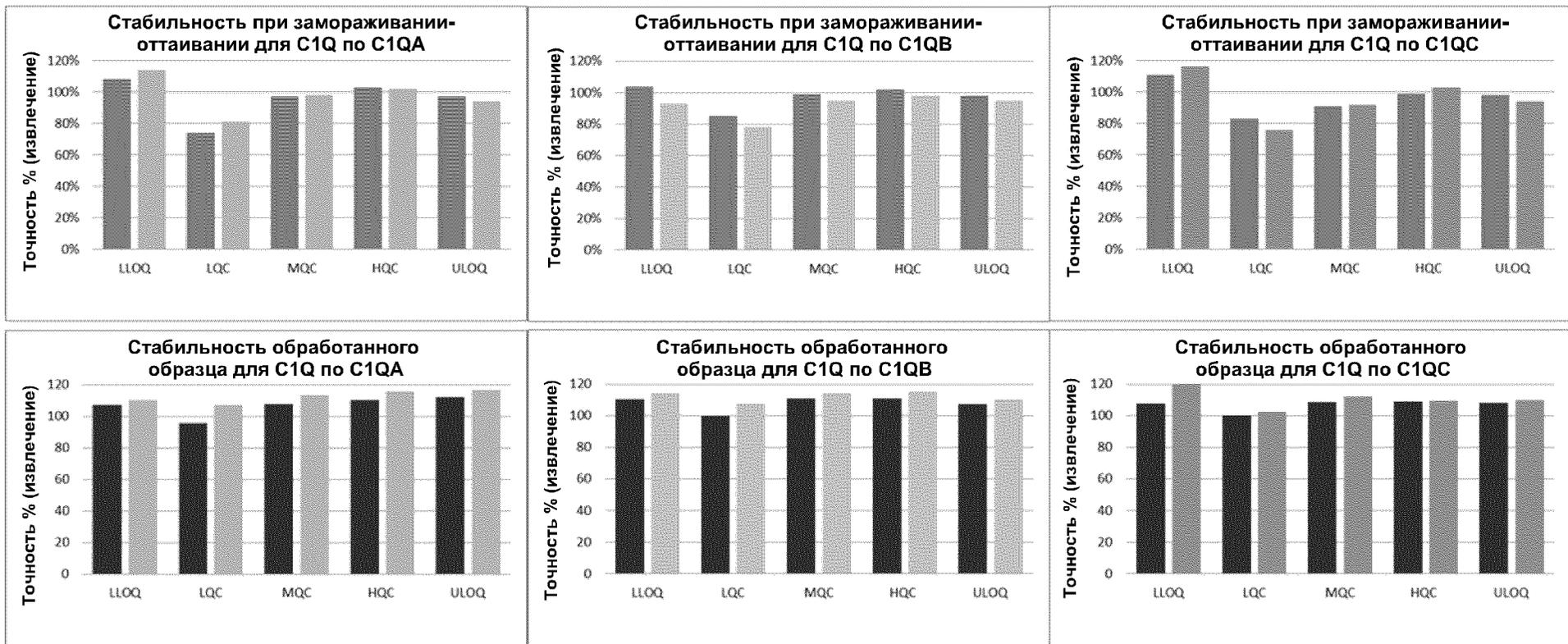


12/17

ФИГ. 12

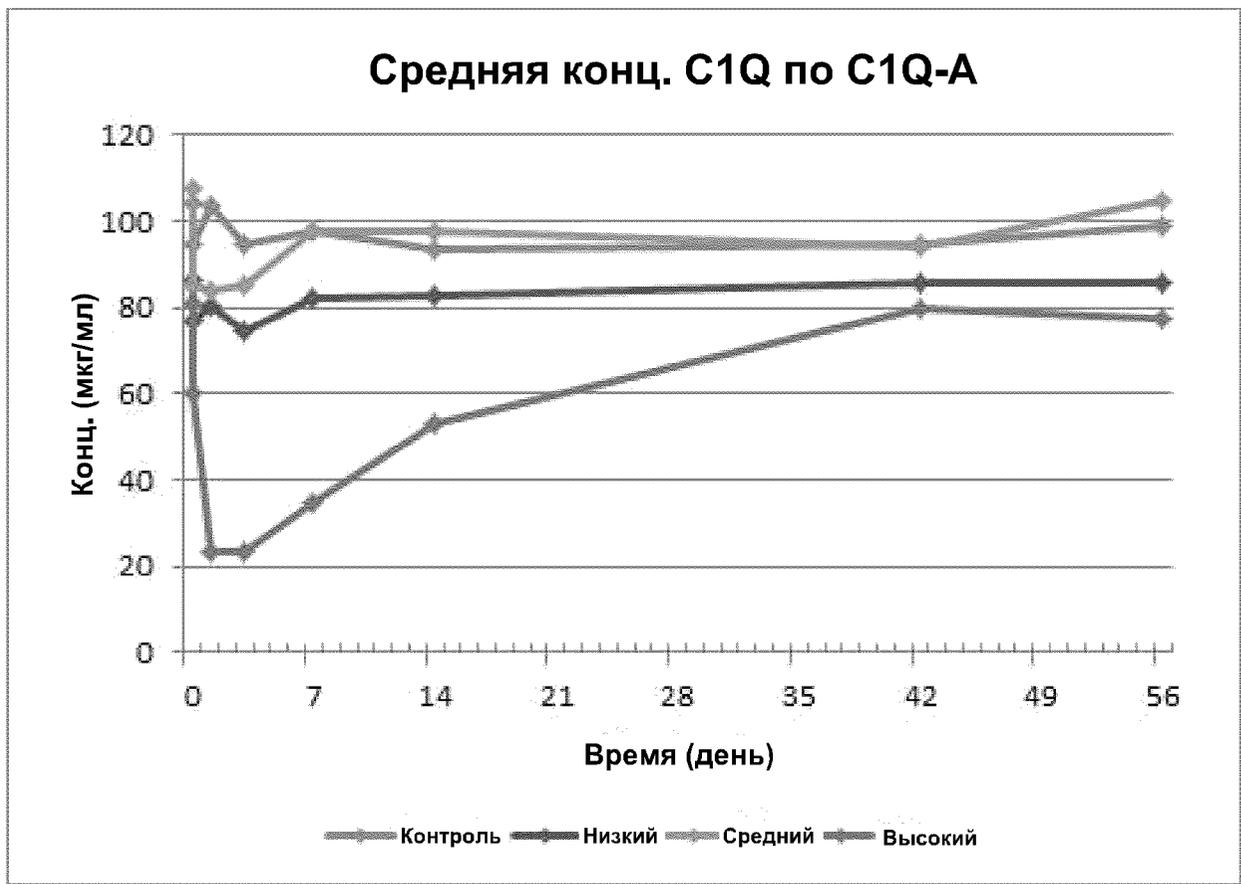


ФИГ. 13



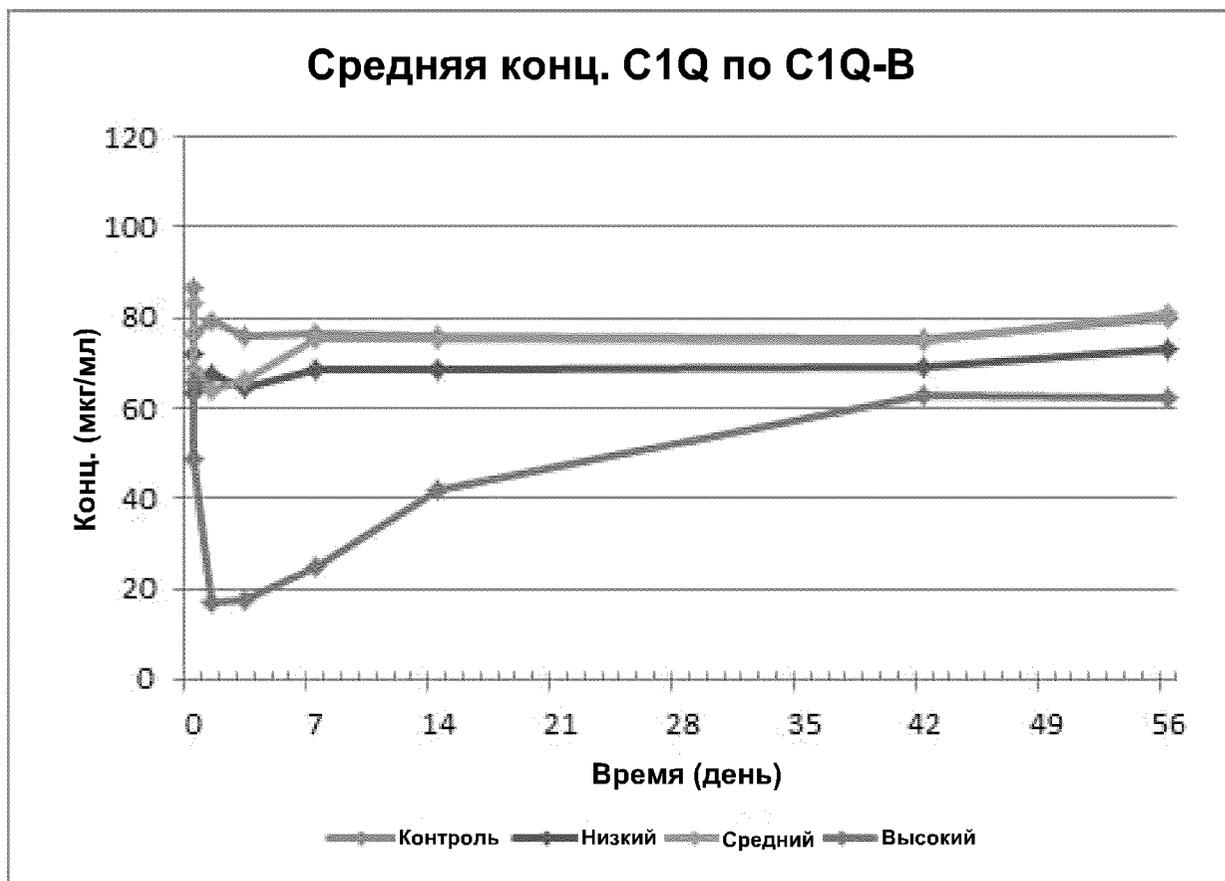
14/17

ФИГ. 14



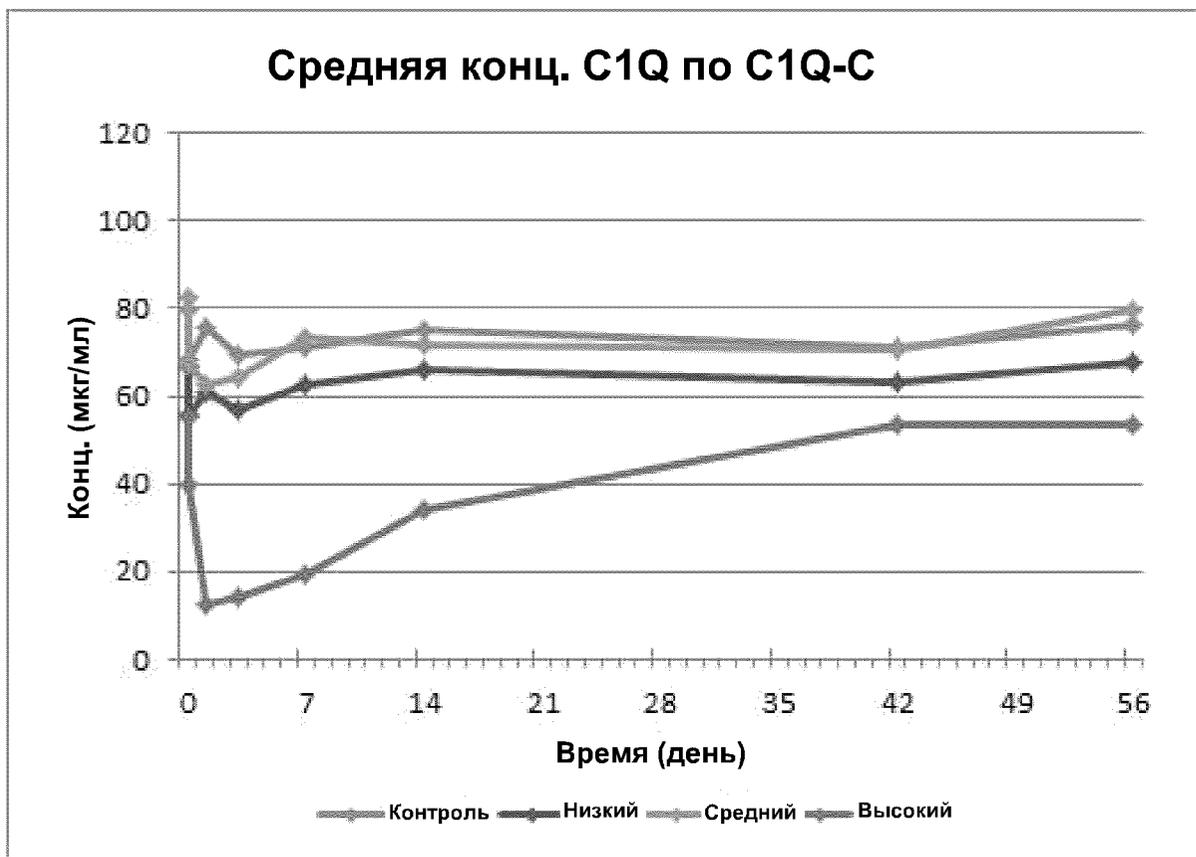
15/17

ФИГ. 15



16/17

ФИГ. 16



17/17

ФИГ. 17