

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202192850 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2022.01.26

(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)  
G01N 1/40 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2020.04.16

(54) ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

(31) 62/835,065

(72) Изобретатель:

(32) 2019.04.17

Чэнь И-Хсуань, Ли Нин, Сяо Хой (US)

(33) US

(86) PCT/US2020/028458

(74) Представитель:

(87) WO 2020/214777 2020.10.22

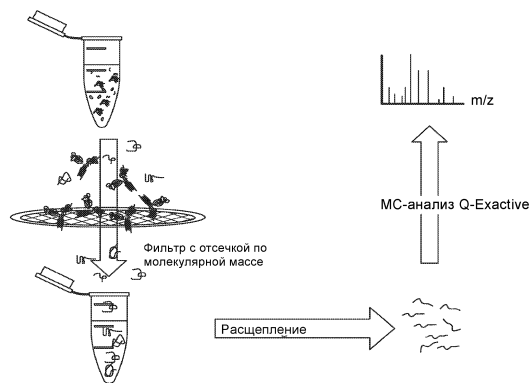
Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) В данном изобретении предложен способ идентификации белков клетки-хозяина в матрице образца. Способ включает проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка; проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе и идентификацию белка клетки-хозяина, предпочтительно с помощью масс-спектрометрии.



A1

202192850

202192850

A1

## **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

2420-571349EA/019

### **ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА**

#### **ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ**

Изобретение в целом относится к способам идентификации белков клетки-хозяина.

#### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

Биофармацевтические продукты на основе белков стали важными лекарственными средствами для лечения рака, аутоиммунного заболевания, инфекции и кардиометаболических расстройств, и они представляют собой один из наиболее быстрорастущих сегментов продуктов фармацевтической промышленности. Биофармацевтические продукты на основе белка должны соответствовать очень высоким стандартам чистоты. Таким образом, может быть важно контролировать любые примеси в таких биофармацевтических продуктах на различных этапах разработки, производства, хранения и использования лекарственных средств.

Например, белки клетки-хозяина (БКХ) могут присутствовать в биофармацевтических препаратах на основе белка, которые разрабатываются с использованием клеточных систем. Присутствие БКХ в лекарственных средствах должно контролироваться и может быть неприемлемым при превышении определенного количества. Аналитические методы анализа для определения характеристик БКХ должны обладать достаточной точностью и разрешающей способностью. Прямой анализ может потребовать выделения продукта в достаточно большом количестве для анализа, что нежелательно и возможно только в отдельных случаях. Следовательно, определение рабочего процесса и аналитических тестов для характеристики БКХ в образце при смешивании с чрезмерно высокой концентрацией активного лекарственного средства является сложной задачей. Из вышесказанного следует, что существует потребность в улучшенных способах определения содержания БКХ в образце.

#### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Ключевым критерием при разработке биофармацевтических продуктов может быть мониторинг примесей в продукте. Когда такие примеси все же появляются, их идентификация и количественное определение представляют собой важный этап биопроцесса.

Иллюстративные варианты осуществления, раскрытые в данном документе, удовлетворяют вышеупомянутым требованиям, предоставляя способы идентификации белка(ов) клетки-хозяина.

В одном иллюстративном варианте осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка и проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе; В одном из аспектов данного варианта осуществления диссоциация белка может быть осуществлена с использованием агента, диссоциирующего

белок. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать дезоксихолат натрия. В другом аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать N-лауроилсаркозин. В другом конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать дезоксихолат натрия и N-лауроилсаркозин. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может быть деградируемым по своей природе. В одном аспекте данного варианта осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 100 кДа. В другом аспекте данного варианта осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 50 кДа. В одном аспекте данного варианта осуществления, способ может быть адаптирован для обнаружения белков клетки-хозяина, которые находятся в концентрации по меньшей мере около 1 ч/млн. В одном из аспектов данного варианта осуществления этап фильтрации обогащает диссоциированный белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 50 раз. В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может дополнительно включать приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом. В другом аспекте данного варианта осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может дополнительно включать идентификацию белка клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

В одном иллюстративном варианте осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка, проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, и приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом. В одном из аспектов данного варианта осуществления диссоциация белка может быть осуществлена с использованием агента, диссоциирующего белок. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать дезоксихолат натрия. В другом аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать N-лауроилсаркозин. В другом конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать дезоксихолат натрия и N-лауроилсаркозин. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может быть деградируемым по своей природе. В одном аспекте данного варианта осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 100 кДа. В одном аспекте данного варианта осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 50 кДа. В одном аспекте данного варианта осуществления способ может быть адаптирован для обнаружения только белков клетки-хозяина, концентрация которых при пределе обнаружения способа может составлять по меньшей мере около 1 ч/млн. В одном из

аспектов данного варианта осуществления этап фильтрации обогащает диссоциированный белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 50 раз. В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может дополнительно включать приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом. В другом аспекте данного варианта осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может дополнительно включать идентификацию белка клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В одном аспекте данного варианта осуществления гидролизующий агент может представлять собой трипсин. В одном из аспектов данного варианта осуществления способ может дополнительно включать приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с агентом, восстанавливающим белок. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, восстанавливающий белок, может представлять собой ТСЕР. В другом аспекте данного варианта осуществления способ может дополнительно включать приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с агентом, алкилирующим белок. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, алкилирующий белок, может представлять собой САА. В еще одном аспекте данного варианта осуществления способ может дополнительно включать центрифугирование отфильтрованного белка клетки-хозяина.

В одном иллюстративном варианте осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка, проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, и идентификацию белка клетки-хозяина. В одном из аспектов данного варианта осуществления диссоциация белка может быть осуществлена с использованием агента, диссоциирующего белок. В одном из аспектов данного варианта осуществления диссоциация белка может быть осуществлена с использованием агента, диссоциирующего белок. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать дезоксихолат натрия. В другом аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать N-лауроилсаркозин. В другом конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать дезоксихолат натрия и N-лауроилсаркозин. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может быть деградируемым по своей природе. В одном аспекте данного варианта осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 100 кДа. В одном аспекте данного варианта осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 50 кДа. В одном из аспектов данного варианта осуществления идентификация белка клетки-хозяина может быть проведена с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте данного варианта осуществления масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В другом конкретном аспекте данного варианта осуществления система

жидкостной хроматографии может быть системой нано-жидкостной хроматографии. В другом конкретном аспекте данного варианта осуществления масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр. В одном аспекте данного варианта осуществления, способ может быть адаптирован для обнаружения белков клетки-хозяина, которые находятся в концентрации по меньшей мере около 1 ч/млн. В одном из аспектов данного варианта осуществления этап фильтрации обогащает диссоциированный белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 50 раз. В одном аспекте данного варианта осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может дополнительно включать приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом.

В одном иллюстративном варианте осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка, проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом и идентификацию белка клетки-хозяина. В одном из аспектов данного варианта осуществления диссоциация белка может быть осуществлена с использованием агента, диссоциирующего белок. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать дезоксихолат натрия. В другом аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать N-лауроилсаркозин. В другом конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может содержать дезоксихолат натрия и N-лауроилсаркозин. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, диссоциирующий белок, может быть деградируемым по своей природе. В одном аспекте данного варианта осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 100 кДа. В одном аспекте данного варианта осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 50 кДа. В одном аспекте данного варианта осуществления гидролизующий агент может представлять собой трипсин. В одном аспекте данного варианта осуществления, способ может быть адаптирован для обнаружения белков клетки-хозяина, которые находятся в концентрации по меньшей мере около 1 ч/млн. В одном из аспектов данного варианта осуществления этап фильтрации обогащает диссоциированный белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 50 раз. В одном из аспектов данного варианта осуществления идентификация белка клетки-хозяина может быть проведена с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте данного варианта осуществления масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В другом конкретном аспекте данного варианта осуществления система жидкостной хроматографии может быть системой нано-жидкостной хроматографии. В другом конкретном аспекте данного варианта осуществления масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр. В одном из аспектов данного варианта

осуществления способ может дополнительно включать приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с агентом, восстанавливающим белок. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, восстанавливающий белок, может представлять собой ТСЕР. В другом аспекте данного варианта осуществления способ может дополнительно включать приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с агентом, алкилирующим белок. В конкретном аспекте данного варианта осуществления агент, алкилирующий белок, может представлять собой САА. В еще одном аспекте данного варианта осуществления способ может дополнительно включать центрифугирование отфильтрованного белка клетки-хозяина.

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

Файл патента или заявки содержит по крайней мере одну фигуру, выполненную в цвете. Копии публикации этого патента или заявки на патент с цветной фигурой (фигурами) будут предоставлены ведомством по запросу и уплате необходимой пошлины.

На фиг. 1 показан экспериментальный рабочий процесс идентификации БКХ (белка клетки-хозяина) с использованием фильтрации с отсечением по молекулярной массе в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 2 показан график суммарной ионной хроматографии, полученный в результате прямого расщепления стандарта NIST.

На фиг. 3 показан график суммарной ионной хроматографии, полученный из стандарта NIST, обработанного методом идентификации БКХ в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 4 показаны ХИС одного пептида с  $m/z$  546.60<sup>3+</sup> без использования способа идентификации БКХ и с ним в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 5 показано целевое количественное определение (PRM) пептида LA YINPADLAEEK из стресс-индуцированного фосфопротеина 1 в стандарте NIST до и после способа идентификации БКХ согласно иллюстративному варианту осуществления.

На фиг. 6 показана диаграмма Венна, определяющая белки и пептиды, перекрывающиеся между дублированными прогонами способа идентификации БКХ, выполненного в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 7 показано сравнение интенсивностей белков и пептидов в двух отдельных дублированных прогонах способа идентификации БКХ, выполненных в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления.

На фиг. 8 показана диаграмма Венна сравнения идентификации между способом идентификации БКХ, выполненным в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления, методами ограниченного расщепления и двумерной ЖХ-МС/МС.

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

С тех пор как первое терапевтическое моноклональное антитело (mAb), муромона-CD3, было одобрено FDA в 1992 году для лечения пациентов с острым отторжением при пересадке органов, более 80 терапевтических mAb были одобрены для клинического

применения с большим успехом. В процессе клеточного производства этих терапевтических белков конечный лекарственный продукт на основе белка должен быть высокоочищен, чтобы примеси из клеток были на приемлемо низком уровне до клинического применения. Примеси, в частности, белки клеток-хозяев (БКХ), полученные из системы экспрессии млекопитающих (например, клеток яичника китайского хомячка (СНО)), должны контролироваться. Общие рекомендации по уровню содержания БКХ в конечной субстанции лекарственного средства составляют менее 100 ч/млн (John H. Chon & Gregory Zarbis-Papastoitsis, *Advances in the production and downstream processing of antibodies*, 28 *NEW BIOTECHNOLOGY* 458-463 (2011)). Однако даже общие примеси БКХ, присутствующие на низком уровне в субстанции лекарственного средства, следовые количества БКХ могут быть неприемлемы для некоторых конкретных БКХ, которые могут вызвать иммунный ответ, быть токсичными или биологически активными после инъекции (J.R. Bierich, *Treatment of Pituitary Dwarfism with Biosynthetic Growth Hormone*, 75 *ACTA PAEDIATRICA* 13-18 (1986); T. Romer et al., *Efficacy and safety of a new ready-to-use recombinant human growth hormone solution*, 30 *JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION* 578-589 (2007); Daniel G. Bracewell, Richard Francis & C. Mark Smales, *The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control*, 112 *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* 1727-1737 (2015); Saloumeh Kadkhodayan Fischer et al., *Specific Immune Response to Phospholipase B-Like 2 Protein, a Host Cell Impurity in Lebrikizumab Clinical Material*, 19 *THE AAPS JOURNAL* 254-263 (2016)). Также может быть недопустимым чтобы БКХ обладали способностью разрушать антитело или изменять связывающую способность антитела (Nitin Dixit et al., *Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles*, 105 *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* 1657-1666 (2016); Troii Hall et al., *Polysorbates 20 and 80 Degradation by Group XV Lysosomal Phospholipase A2 Isomer X1 in Monoclonal Antibody Formulations.*, 105 *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES* 1633-1642)). Поэтому может быть желательно иметь способы, пригодные для контроля все компонентов БКХ по отдельности.

Традиционно для количественной оценки общего содержания БКХ используется иммуноферментный анализ (ИФА) с поликлональными антителами к БКХ (Denise C. Krawitz et al., *Proteomic studies support the use of multi-product immunoassays to monitor host cell protein impurities*, 6 *PROTEOMICS* 94-110 (2006); Catherine Em Hogwood, Daniel G Bracewell & C Mark Smales, *Host cell protein dynamics in recombinant СНО cells*, 4 *BIOENGINEERED* 288-291 (2013)). Учитывая потребность в измерении отдельных компонентов БКХ, ИФА может не быть окончательным решением для оценки уровня БКХ. Кроме того, некоторые слабо- или неиммуногенные БКХ могут не вырабатывать антитела для обнаружения в ИФА, поэтому такие БКХ не могут быть обнаружены.

Для мониторинга БКХ был использован ряд дополнительных аналитических подходов, включая 1D/2D-PAGE и аналитические технологии на основе масс-

спектрометрии. (Julita K. Grzeskowiak et al., Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparison of affinity and non-affinity based downstream processing of recombinant monoclonal antibody, 1216 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 4902-4912 (2009); Catalin Doneanu et al., Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, 4 MAbs 24-44 (2012); Mi Jin et al., Profiling of host cell proteins by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Implications for downstream process development, 105 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 306-316 (2010)). Жидкостная хроматография, связанная с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС), также может служить средством для одновременной идентификации и количественного определения примесей БКХ и стала основным ортогональным методом, дополняющим анализ ИФА. Однако основной проблемой для метода, основанного на масс-спектрометрии, может стать то, что масс-спектрометр сам по себе не способен обнаружить низкую концентрацию БКХ при смешивании с переполненным высококонцентрированным антителом лекарственным веществом. Для преодоления проблемы широкого динамического диапазона (более 6 порядков величины) между БКХ с низким уровнем ч/млн и терапевтическим антителом с высоким содержанием, одна из стратегий заключается в разрешении взаимодействующих пептидов перед масс-спектрометрическим анализом, добавляя еще одно измерение разделения, такое как 2D-ЖХ и ионная подвижность, поверх обнаружения, зависящего от данных, или обнаружения, не зависящего от данных, для повышения эффективности разделения. В одном исследовании Эккер и др. сообщили об идентификации БКХ на уровне одной цифры ч/млн с помощью ЖХ-МС/МС с независимым получением данных, а также создали библиотеку, включающую массы, время удерживания и фрагментные ионы для БКХ из нулевых штаммов. Хотя этот метод является чувствительным, он может потерять БКХ, которые коэкспрессируются только с определенным продуктом (Dawn M Ecker, Susan Dana Jones & Howard L Levine, The therapeutic monoclonal antibody market, 7 MAbs 9-14 (2014)). Другое исследование показало возможность определения от 10 до 50 ч/млн БКХ с помощью 2D-ВЭЖХ с ионной подвижностью (Catalin Doneanu et al., Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, 4 MAbs 24-44 (2012)). Однако время цикла 2D-ЖХ очень велико, и этот метод недостаточно чувствителен для анализа более низкого уровня БКХ (<10 ч/млн). Другие стратегии направлены на подготовку образца для обогащения БКХ путем удаления антител из образца с помощью аффинной очистки, ограниченного расщепления или захвата БКХ с помощью поликлональных антител (Lihua Huang et al., A Novel Sample Preparation for Shotgun Proteomics Characterization of HCPs in Antibodies, 89 ANALYTICAL CHEMISTRY 5436-5444 (2017); Jenny Heidbrink Thompson et al., Improved detection of host cell proteins (HCPs) in a mammalian cell-derived antibody drug using liquid chromatography/mass spectrometry in conjunction with an HCP-enrichment strategy, 28 RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY 855-860 (2014); James A Madsen et al., Toward the complete characterization of host cell proteins in biotherapeutics via affinity depletions, LC-



MS/MS, and multivariate analysis, 7 MAVS 1128-1137 (2015)).

Одной из основных проблем существующих методов может быть недостаточная способность определять низкие концентрации БКХ в образце (например, 0,01-10 ч/млн) при широком динамическом диапазоне (5-8 порядков) между БКХ и лекарственным средством, что может привести к маскировке сигнала БКХ в анализе.

Учитывая ограничения существующих методов, был разработан эффективный и действенный способ идентификации БКХ.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании, сейчас описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в настоящий документ посредством ссылки.

Формы единственного числа следует понимать как означающие «по меньшей мере один»; и термины «около» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартные вариации, как будет понятно специалистам в данной области техники; а если указаны диапазоны, то включены конечные точки.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления раскрытый способ позволяет идентифицировать белок клетки-хозяина в матрице образца.

В контексте данного документа термин «белок клетки-хозяина» включает белок, полученный из клетки-хозяина, и может быть не связан с желаемым белком, представляющим интерес. Белок клетки-хозяина может представлять собой технологическую примесь, которая может быть образована в ходе процесса производства и может включать три основные категории: образованные из клеточного субстрата, образованные из клеточной культуры и образованные в ходе последующих стадий. Примеси, образованные из клеточного субстрата, включают без ограничения белки, полученные из организма-хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или общую ДНК клетки-хозяина). Примеси, полученные из клеточной культуры, включают без ограничения индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Образованные в ходе последующих стадий примеси включают без ограничения ферменты, химические и биохимические реагенты для обработки (например, бромистый цианоген, гуанидин, окисляющие и восстанавливающие средства), неорганические соли (например, тяжелых металлов, мышьяка, иона неметалла), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие выщелачиваемые продукты.

При производстве белка с использованием клеточных систем сам продукт перед использованием должен быть очищен от любых клеточных примесей до приемлемого уровня. Примеси, которые могут быть получены из систем экспрессии, при которых не только представляющий интерес белок секретируется в жидкость клеточной культуры, которая собирается для сбора, но и белок(белки) клетки-хозяина (БКХ), нуклеиновые кислоты, липиды и другие клеточные материалы, которые могут выделяться в

культуральную среду вместе с примесями продукта (см. Bracewell, выше). В частности, необходимо контролировать БКХ и в конечном продукте, поскольку они могут быть неприемлемы для конкретного БКХ с точки зрения риска или деградации продукта или привести к развитию иммуногенных форм продукта. При последующей обработке можно использовать сепарацию для выделения интересующего белка из разнообразного спектра БКХ.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления матрица образца может включать представляющий интерес белок.

Применяемый в данном документе термин «представляющий интерес белок» включает любой аминокислотный полимер с ковалентно связанными амидными связями. Белки содержат одну или более аминокислотных полимерных цепей, обычно известных в данной области как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, соответствующих встречающимся в природе структурным вариантам и их синтетическим не встречающимся в природе аналогам, связанных посредством пептидных связей, соответствующих встречающимся в природе структурным вариантам, и их синтетическим не встречающимся в природе аналогам. «Синтетические пептиды или полипептиды» относятся к не встречающимся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с использованием автоматического синтезатора полипептидов. Различные методы твердофазного синтеза пептидов известны специалистам в данной области техники. Белок может содержать один или более полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, применяемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других Fc-слитых белков химерного рецептора, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител и биспецифических антитела. В другом иллюстративном аспекте белок может включать фрагменты антитела, нанотела, химеры рекомбинантного антитела, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с использованием систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как система бакуловирусов насекомых, системы дрожжей (например, *Pichia sp.*), системы млекопитающих (например, CHO-клетки и производные CHO-клеток, такие как CHO-K1-клетки). Обзор биотерапевтических белков и их получения см. в Ghaderi et al., «Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation,» (BIOTECHNOL. GENET. ENG. REV. 147-175 (2012)). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Данные модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, FLAG-метку, мальтозосвязывающий белок (MBP), хитинсвязывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST), мус-эпитоп,

флуоресцентные метки и другие красители и т. п. Белки могут быть классифицированы на основании композиций и растворимости и, таким образом, могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и фибриллярные белки; конъюгированные белки, такие как , нуклеопротеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и производные белки, такие как , первичные производные белки и вторичные производные белки.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления представляющий интерес белок может быть антителом, биспецифическим антителом, мультиспецифическим антителом, фрагментом антитела, моноклональным антителом, белком клетки-хозяина или их комбинациями.

Применяемый в данном документе термин «антитело», включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как HCVR или V<sub>H</sub>) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначаемую в данном документе как LCVR или V<sub>L</sub>) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C.sub.L1). V<sub>H</sub>- и V<sub>L</sub>-области могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями более консервативных областей, называемых каркасными областями (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных иллюстративных вариантах осуществления FR антитела против big-ET-1 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Применяемый в данном документе термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела.

Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с использованием любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной геномной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК

известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием методов молекулярной биологии, например, для размещения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

Используемый в данном документе термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент Fc, фрагмент scFv, фрагмент Fv, диатело dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а ScFv-белки представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. Фрагмент антитела можно получить различными способами. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем с помощью фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. Альтернативно или дополнительно фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны вместе, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно содержать многомолекулярный комплекс.

Применяемый в данном документе термин «моноклональное антитело» не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, посредством любых способов, доступных или известных в данной области. Моноклональные антитела, пригодные для использования в настоящем изобретении, могут быть получены с использованием широкого спектра методов, известных в данной области техники, включая использование технологий гибридомной, рекомбинантной и фаговой индикации или их комбинации.

В конкретном аспекте представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из афлиберцепта, рекомбинантного Mini-Trap (примеры которого раскрыты в патенте США № 7279159), scFv и других белков к VEGF. В предпочтительном аспекте представляющий интерес рекомбинантный белок представляет собой афлиберцепт.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления матрица образца может

дополнительно содержать примеси, связанные с продуктом.

В контексте данного документа «примеси, связанные с продуктом» (например, прекурсоры, некоторые продукты разложения) могут представлять собой молекулярные варианты, возникающие в ходе производства и/или хранения, которые не обладают свойствами, сопоставимые со свойствами необходимого продукта относительно активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут требовать значительных усилий для выделения и характеристики с целью идентификации типа модификации(-ий). Родственные примеси могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образованы гидрофильными ферментами или химическими веществами, которые катализируют отщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают без ограничения дезамидированные; изомеризованные, ошибочно соединенные посредством S-S, окисленные или измененные конъюгированные формы (например, гликозилированные, фосфорилированные). Модифицированные формы также могут включать любые посттрансляционные модифицированные формы. Агрегаты включают димеры и большие величины необходимого продукта. (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH August 1999, U.S. Dept. of Health and Humans Services).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления матрица образца может представлять собой белковый состав.

Используемый в данном документе термин «композиция с белком» относится к терапевтическому белку, который составлен вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления терапевтический белок присутствует в количестве стандартной дозы, подходящем для введения в схеме лечения. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления состав может дополнительно содержать эксципиенты, включая, но не ограничиваясь ими, буферные агенты, объемообразующие вещества, модификаторы тоничности, поверхностно-активные вещества, солубилизирующие агенты и консерванты. Другие дополнительные эксципиенты также могут быть выбраны на основе функции и совместимости с составами, например, в LOYD V. ALLEN, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (19 ed. 1995), JOHN E HOOVER, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (1975) и LYOD ALLEN, ANSEL'S PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS (10 ed.) включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка. Диссоциация белка клетки-хозяина от представляющего интерес белок может быть осуществлена с помощью агента, диссоциирующего белок. Неограничивающие примеры агента, диссоциирующего белок, включают высокую температуру, высокий или низкий pH или воздействие хаотропных агентов. В качестве диссоциирующих агентов для белков

можно использовать несколько хаотропных агентов. Хаотропные растворители увеличивают энтропию системы, вмешиваясь во внутримолекулярные взаимодействия, опосредованные нековалентными силами, такими как водородные связи, силы Ван-дер-Ваальса и гидрофобные эффекты. Неограничивающие примеры хаотропных агентов включают бутанол, этанол, хлорид гуанидиния, перхлорат лития, ацетат лития, хлорид магния, фенол, пропанол, додецилсульфат натрия, тиомочевину, N-лауроилсаркозин, мочевины и их соли. В одном аспекте проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка может включать проведение денатурации интересующего белка. В другом аспекте проведение диссоциации клетки-хозяина от интересующего белка может включать проведение денатурации белка клетки-хозяина. В контексте данного документа термин «проведение денатурации» относится к процессу, в котором трехмерная форма молекулы изменяется по сравнению с ее нативным состоянием без разрыва пептидных связей.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе.

В контексте данного документа термин «фильтр с отсечкой по молекулярной массе» может включать фильтры или мембраны или методы фильтрации, которые могут обладать способностью задерживать по меньшей мере около 90% растворителя или белка с известной молекулярной массой (кДа). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 30 кДа. В некоторых других иллюстративных вариантах осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 50 кДа. В некоторых других иллюстративных вариантах осуществления фильтр с отсечкой по молекулярной массе может иметь отсечку по меньшей мере около 100 кДа. Фильтры с отсечкой по молекулярной массе можно приобрести у нескольких коммерческих поставщиков, например Microcon, Millipore, Centriscart, Sartorius, Amicon Ultra, Millipore, Vivaspin и Sartorius. Фильтр с отсечкой по молекулярной массе может быть выбран на основе требуемого отсека по молекулярной массе, условий эксплуатации, концентрации фильтруемого образца или состава фильтруемого образца. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может включать приведение в контакт белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка, проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, и приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом.

Применяемый в данном документе термин «гидролизующий агент» относится к любому одному или комбинации большого числа различных агентов, которые могут осуществлять расщепление белка. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают трипсин, эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C, протеазу внешней мембраны T (OmpT), разрушающий иммуноглобулин фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназу и протеазу из *Aspergillus Saitoi*. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают применение высокой температуры, микроволн, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения, растворителей (неограничивающими примерами являются этанол и ацетонитрил), расщепления иммобилизованными ферментами (IMER), иммобилизованных на магнитных частицах ферментов и иммобилизованных внутри кристалла ферментов. Недавний обзор, в котором обсуждаются доступные методы расщепления белков, см. в Switazar et al., "Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments" (Linda Switazar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments, 12 JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH 1067-1077 (2013)). Один или комбинация гидролизующих агентов может расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде специфическим для последовательности образом, создавая предсказуемую коллекцию более коротких пептидов.

Соотношение гидролизующего агента и белка и время, необходимое для расщепления, могут быть соответствующим образом подобраны для получения расщепления белка. Если соотношение фермента и субстрата неподходяще высокое, то соответственно высокая скорость расщепления не даст достаточно времени для анализа пептидов на масс-спектрометре, и охват последовательности будет нарушен. С другой стороны, при низком соотношении E/S потребуется длительное расщепление и, следовательно, длительное время сбора данных. Соотношение фермента и субстрата может составлять от около 1:0,5 до около 1:200. Применяемый в данном документе термин «расщепление» относится к гидролизу одного или более пептидных связей белка. Существует несколько подходов к проведению расщепления белка в образце с использованием подходящего гидролизующего средства, например, ферментативное расщепление или неферментативное расщепление.

Один из общепринятых методов расщепления белков в образце включает использование протеаз. Существует множество протеаз, и каждая из них имеет свои особенности в плане специфичности, эффективности и оптимальных условий расщепления. Протеазы относятся к эндопептидазам и экзопептидазам и классифицируются по способности протеазы расщеплять нетерминальные или терминальные аминокислоты в пептиде. В качестве альтернативы, протеазы также относятся к шести различным классам - аспаргиновой, глутаминовой и металлопротеазам, цистеиновой, сериновой и треониновой протеазам, классифицированным по механизму

катализа. Термины «протеаза» и «пептидаза» используются как взаимозаменяемые для обозначения ферментов, гидролизующих пептидные связи.

Помимо приведения в контакт белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом, способ может дополнительно включать этапы восстановления белка клетки-хозяина, алкилирования белка клетки-хозяина, буферизации белка клетки-хозяина и/или обессоливания матрицы образца. Эти этапы могут быть выполнены любым подходящим способом по желанию.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может дополнительно включать приведение в контакт белка клетки-хозяина с агентом, восстанавливающим белок.

В контексте данного документа, термин «агент, восстанавливающий белок» относится к агенту, используемому для восстановления дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающими примерами агентов, восстанавливающих белок, применяемых для восстановления белка, являются дитиотреитол (ДТТ), β-меркаптоэтанол, реактив Элмана, хлористоводородный гидроксилламин, цианоборгидрид натрия, трис(2-карбоксиэтил)гидрохлорид фосфина (ТСЕР-НСl) или их комбинаций.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может дополнительно включать приведение в контакт белка клетки-хозяина с агентом, алкилирующим белок.

В контексте данного документа термин «агент, алкилирующий белок» относится к агенту, используемому для алкилирования определенных свободных аминокислотных остатков в белке. Неограничивающими примерами агентов, алкилирующих белок, являются иодоацетамид (IOA), хлорацетамид (CAA), акриламид (AA), N-этилмалеимид (NEM), метилметанэтиосульфат (ММТС) и 4-винилпиридин или их комбинации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка, проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, и идентификации белка клетки-хозяина с использованием восходящего подхода или подхода шотган-протеомики.

В традиционном эксперименте по методу «восходящего подхода» белок может быть расщеплен на небольшие полипептиды, которые необходимо охарактеризовать. Затем смесь пептидов может быть подвергнута масс-спектрометрическому анализу. Идентификация пептида может быть дополнительно проведена путем сравнения масс-спектров, полученных в результате фрагментации полипептида, с теоретическими масс-спектрами, полученными в результате расщепления белка *in silico*. Вывод белков осуществляется путем присвоения пептидной последовательности белкам.

Общий рабочий процесс картирования пептидов может включать этапы денатурации белка, восстановление и алкилирование остатков цистеина, протеолитическое расщепление и анализ методом жидкостной хроматографии с



тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС) (Pavel V. Bondarenko et al., Mass measurement and top-down HPLC/MS analysis of intact monoclonal antibodies on a hybrid linear quadrupole ion trap-orbitrap mass spectrometer, 20 JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY 1415-1424 (2009); James H. Bourell et al., Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Recombinantly Engineered Antibody Fragments, 66 ANALYTICAL CHEMISTRY 2088-2095 (1994); Wei Zhang et al., Complete disulfide bond assignment of a recombinant immunoglobulin G4 monoclonal antibody, 311 ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 1-9 (2002); Daniel J. Kroon et al., Rapid profiling of carbohydrate glycoforms in monoclonal antibodies using MALDI/TOF mass spectrometry, 13 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 1049-1054 (1995); B. W. Gibson & K. Biemann, Strategy for the mass spectrometric verification and correction of the primary structures of proteins deduced from their DNA sequences., 81 PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES 1956-1960 (1984); Dirk Chelius, Douglas S. Rehder & Pavel V. Bondarenko, Identification and Characterization of Deamidation Sites in the Conserved Regions of Human Immunoglobulin Gamma Antibodies, 77 ANALYTICAL CHEMISTRY 6004-6011 (2005); Neil Kelleher, Top-down proteomics; 76 ANALYTICAL CHEMISTRY 197A-203A (2004); Yuan Mao et al., Top-Down Structural Analysis of an Intact Monoclonal Antibody by Electron Capture Dissociation-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance-Mass Spectrometry, 85 ANALYTICAL CHEMISTRY 4239-4246 (2013); Yury O. Tsybin et al., Structural Analysis of Intact Monoclonal Antibodies by Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry, 83 ANALYTICAL CHEMISTRY 8919-8927 (2011); Luca Fornelli et al., Analysis of Intact Monoclonal Antibody IgG1 by Electron Transfer Dissociation Orbitrap FTMS, 11 MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS 1758-1767 (2012); Catherine A. Srebalus Barnes & Amareth Lim, Applications of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals, 26 MASS SPECTROMETRY REVIEWS 370-388 (2007)). Благодаря быстрому прогрессу в области жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии, этот метод пептидного картирования теперь может регулярно генерировать почти полный охват последовательности и, таким образом, стал эффективным подходом для подтверждения идентичности моноклональных антител.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать белка клетки-хозяина от интересующего белка, проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, и проведение идентификации белка клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

Применяемый в данном документе термин «масс-спектрометр» включает устройство, способное идентифицировать конкретные виды молекул и точное измерение их масс. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в котором полипептид или пептид могут быть элюированы для детекции и/или характеристики. Масс-спектрометр может включать три основные части: источник ионов, масс-анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в образовании ионов

газовой фазы. Атомы, молекулы или кластеры определяемого вещества могут переноситься в газовую фазу и ионизированы одновременно (как в ионизации электрораспылением) или в ходе отдельных процессов. Выбор источника ионов в основном зависит от применения.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр.

Применяемый в данном документе термин «тандемная масс-спектрометрия» включает методику, в которой структурную информацию о молекулах образца получают посредством применения нескольких этапов массового отбора и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что образцы молекул могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в интактном состоянии и что они могут быть вызваны распадом некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первой стадии массового отбора. Многостадийную MS/MS, или MS<sup>n</sup>, можно осуществлять посредством первого выбора и выделения иона прекурсора (MS<sup>2</sup>), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона (MS<sup>3</sup>), его фрагментация, выделение вторичного фрагмента (MS<sup>4</sup>), и так до тех пор, пока можно будет получить значимую информацию или сигнал фрагментного иона поддается обнаружению. Тандемную MS успешно осуществляли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализатора для конкретного применения может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Две основные категории способов тандемной MS представляют собой тандемную в пространстве и тандемную во времени, но есть также гибриды, где тандемные во времени анализаторы соединены в пространстве или с тандемными в пространстве анализаторами. Тандемный в пространстве масс-спектрометр включает источник ионов, устройство активации ионов-прекурсоров и по меньшей мере два не захватывающих масс-анализатора. Конкретные функции разделения массы/заряда могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной секции прибора ионы выбирались, диссоциировали в промежуточной области, а ионы продукта затем передавались в другой анализатор для разделения массы/заряда и сбора данных. В тандемном во времени масс-спектрометре ионы, образующиеся в ионном источнике, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по массе/заряду в одном и том же физическом устройстве.

Выявленные масс-спектрометром пептиды могут применяться в качестве суррогатных представителей интактного белка и их посттрансляционных модификаций. Их можно применять для характеристики белков посредством сопоставления экспериментальных и теоретических данных MS/MS, последние генерируются из возможных пептидов в базе данных последовательностей белков. Характеристика включает без ограничения секвенирование аминокислот фрагментов белка, определение секвенирования белка, определение секвенирования белка *de novo*, определение местоположения посттрансляционных модификаций или определение посттрансляционных модификаций, или анализ сопоставимости, или их комбинации.

Применяемый в данном документе термин «база данных» относится к биоинформатическим инструментам, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров MS-MS по всем возможным последовательностям в базе данных. Неограничивающие примеры таких инструментов представляют собой Mascot (<http://www.matrixscience.com>), Spectrum Mill (<http://www.chem.agilent.com>), PLGS (<http://www.waters.com>), PEAKS (<http://www.bioinformaticssolutions.com>), ProteinPilot (<http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot>), Phenyx (<http://www.phenyx-ms.com>), Sorcerer (<http://www.sagenresearch.com>), OMSSA (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/>), X!Tandem (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>), Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>) или Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии.

Применяемый в данном документе термин «хроматография» относится к процессу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью или газом, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального разделения химических единиц при их протекании вокруг или через стационарную жидкость или твердую фазу. Неограничивающие примеры хроматографии включают традиционную обращеннофазовую (RP), ионообменную (IEX) хроматографию и хроматографию с нормальными фазами (NP). В отличие от хроматографии RP, NP и IEX, в которых гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие и ионное взаимодействие, соответственно, являются доминирующими режимом взаимодействия, в хроматографии со смешанным режимом можно применять комбинацию двух или более данных режимов взаимодействия. С масс-спектрометром можно использовать несколько типов жидкостной хроматографии, например, жидкостную хроматографию быстрого разрешения (ЖХБР), сверхэффективную жидкостную хроматографию (СЭЖХ), сверхбыструю жидкостную хроматографию (СБЖХ) и наножидкостную хроматографию (нЖХ). Более подробно о методе и принципах хроматографии см. Colin et al. (COLIN F. POOLE ET AL., LIQUID CHROMATOGRAPHY FUNDAMENTALS AND INSTRUMENTATION (2017)).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может включать идентификацию белка клетки-хозяина с помощью нисходящей протеомики.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца может включать идентификацию белка клетки-хозяина с помощью нативной МС.

В рамках «восходящего» подхода протеомики могут быть проанализированы интактные белки. Восходящая МС может предоставить полную информацию о последовательности всего белка, обнаруживая все типы РТМ (например,

фосфорилирование, протеолиз, ацетилирование) и варианты последовательности (напр. мутации, полиморфизмы, альтернативно сплайсированные изоформы) одновременно в одном спектре («вид с высоты птичьего полета») без априорного знания (Neil L. Kelleher et al., Top Down versus Bottom Up Protein Characterization by Tandem High-Resolution Mass Spectrometry, 121 JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY 806-812 (1999); B. T. Chait, CHEMISTRY: Mass Spectrometry: Bottom-Up or Top-Down?, 314 SCIENCE 65-66 (2006); Zachery R. Gregorich & Ying Ge, Top-down proteomics in health and disease: Challenges and opportunities, 14 PROTEOMICS 1195-1210 (2014)).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок клетки-хозяина может иметь pI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном иллюстративном конкретном варианте осуществления pI может составлять около 4,5, около 5,0, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1, около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9, около 8,0, около 8,1, около 8,2, около 8,3, около 8,4, около 8,5, около 8,6, около 8,7, около 8,8, около 8,9 или около 9,0.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления типов белков клетки-хозяина в матрице образца может быть по меньшей мере два.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления концентрация белков клетки-хозяина в матрице образца может быть ниже чем около 0,05 ч/млн. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления концентрация белков клетки-хозяина в матрице образца может быть ниже чем около 0,05 ч/млн, ниже чем около 1 ч/млн, ниже чем около 2 ч/млн, ниже чем около 3 ч/млн, ниже чем около 4 ч/млн, ниже чем около 5 ч/млн, ниже чем около 10 ч/млн, ниже чем около 20 ч/млн, ниже чем около 30 ч/млн, ниже чем около 40 ч/млн, ниже чем около 50 ч/млн, ниже чем около 60 ч/млн, ниже чем около 70 ч/млн, ниже чем около 80 ч/млн, ниже чем около 90 ч/млн, ниже чем около 100 ч/млн, ниже чем около 150 ч/млн, ниже чем около 200 ч/млн, ниже чем около 250 ч/млн, ниже чем около 300 ч/млн, ниже чем около 350 ч/млн, ниже чем около 400 ч/млн, ниже чем около 450 ч/млн, ниже чем около 500 ч/млн, ниже чем около 550 ч/млн, ниже чем около 600 ч/млн, ниже чем около 650 ч/млн, ниже чем около 700 ч/млн, ниже чем около 750 ч/млн, ниже чем около 800 ч/млн, ниже чем около 850 ч/млн, ниже чем около 900 ч/млн, ниже чем около 950 ч/млн или ниже чем около 1000 ч/млн.

В другом иллюстративном варианте осуществления матрица образца может быть получена на любом этапе биопроцесса, например, из культуральной жидкости клеток (КЖК), жидкости собранной культуры клеток (ЖСКК), квалификации эксплуатации процесса (КЭП), любого этапа последующей обработки, лекарственного раствора (ЛР) или лекарственного продукта (ЛП), составляющего конечный формулированный продукт. В некоторых других конкретных иллюстративных вариантах осуществления образец может быть выбран из любого этапа последующего процесса осветления, хроматографической очистки, вирусной инактивации или фильтрации. В некоторых конкретных

иллюстративных вариантах осуществления лекарственное средство может быть выбрано из изготовленного лекарственного средства в клинике, при транспортировке, хранении или обращении.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка(ов) клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, может включать проведение диссоциации белка клетки-хозяина от интересующего белка с помощью N-лауроилсаркозина или дезоксихолата натрия или обоих при подходящей температуре.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок клетки-хозяина может быть диссоциирован путем воздействия на белок клетки-хозяина кислым или основным рН. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок клетки-хозяина может быть диссоциирован путем воздействия на белок клетки-хозяина кислым рН, например, при рН около 0, или около 0,5, или около 1, или около 1,5, или около 2, или около 2,5, или около 3, или около 3,5, или около 4, или около 4,5, или около 5, или около 5,5, или около 6. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок клетки-хозяина может быть диссоциирован путем воздействия на белок клетки-хозяина основным рН, например, при рН около 8, или около 8,5, или около 9, или около 9,5, или около 10, или около 10,5, или около 11, или около 11,5, или около 12, или около 12,5, или около 13, или около 13,5, или около 14.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка(ов) клетки-хозяина в матрице образца может включать проведение алкилирования белка клетки-хозяина.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка(ов) клетки-хозяина в матрице образца может необязательно включать этап обессоливания раствора, содержащего белок клетки-хозяина. Обессоливание можно проводить с помощью диализа, ультрафильтрации, обессоливающих хроматографических колонок, колонок гель-фильтрации, центробежной ультрафильтрации или их комбинаций.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ может дополнительно включать расщепление образца в условиях диссоциации. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления образец может быть расщеплен с помощью гидролизующего агента, причем гидролизующий агент может быть выбран из протеазы из *Aspergillus Saitoi*, эластазы, субтилизина, протеазы XIII, пепсина, трипсина, Труп-N, химотрипсина, аспергиллопепсина I, протеазы LysN (Lys-N), эндопротеиназы LysC (Lys-C), эндопротеиназы Asp-N (Asp-N), эндопротеиназы Arg-C (Arg-C), эндопротеиназы Glu-C (Glu-C) или протииеназы наружной мембраны T (OmpT), иммуноглобулин-деградирующего фермента *Streptococcus pyogenes* (IdeS), термолизина, папаина, проназы, протеазы V8 или их биологически активных фрагментов, или их гомологов, или их комбинации. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления концентрация раствора, содержащего гидролизующий агент, может составлять от около 0,1 мкг/мкл до около 100 мкг/мкл. В одном варианте осуществления концентрация

раствора может составлять около 0,1 мкг/мкл, или около 0.2 мкг/мкл, или 0,5 мкг/мкл, или около 1 мкг/мкл, или около 2 мкг/мкл, или около 3 мкг/мкл, или около 4 мкг/мкл, или около 5 мкг/мкл, или около 10 мкг/мкл, или около 15 мкг/мкл, или около 20 мкг/мкл, или около 25 мкг/мкл, или около 30 мкг/мкл, или около 35 мкг/мкл, или около 40 мкг/мкл, или около 45 мкг/мкл, или около 50 мкг/мкл, или около 60 мкг/мкл, или около 70 мкг/мкл, или около 80 мкг/мкл, или около 90 мкг/мкл, или около 100 мкг/мкл. Концентрация белка в образце может составлять от около 0,1 мкг/мкл до около 100 мкг/мкл. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления массовое соотношение гидролизующего агента и белка клетки-хозяина может составлять от около 1:0,1 до около 1:50. Например, соотношение гидролизующего агента и белка клетки-хозяина (масс./масс.) может составлять около 1:0,5, или около 1:1, или около 1:2, или около 1:3, или около 1:4, или около 1:5, или около 1:10, или около 1:15, или около 1:20, или около 1:25, или около 1:30, или около 1:35, или около 1:40, или около 1:45, или около 1:50.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка(ов) клетки-хозяина в матрице образца может включать проведение фильтрации белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления отфильтрованный белок клетки-хозяина может быть отфильтрован с помощью диссоциации. В некоторых других конкретных иллюстративных вариантах осуществления отфильтрованный белок клетки-хозяина может быть отфильтрован без диссоциации.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, молекулярная масса фильтра с отсечкой по молекулярной массе может быть больше, чем около 30 кДа. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления, молекулярно-массовый фильтр фильтра с отсечкой по молекулярной массе может быть больше, чем около 30 кДа, больше, чем около 35 кДа, больше, чем около 40 кДа, больше, чем около 45 кДа, больше, чем около 50 кДа, больше, чем около 55 кДа, больше, чем около 60 кДа, больше, чем около 65 кДа, больше, чем около 70 кДа, больше, чем около 75 кДа, больше, чем около 80 кДа, больше, чем около 85 кДа, больше, чем около 90 кДа, больше, чем около 95 кДа, больше, чем около 100 кДа, больше, чем около 110 кДа, больше, чем около 120 кДа, больше, чем около 130 кДа, больше, чем около 140 кДа, больше, чем около 150 кДа, больше, чем около 160 кДа, больше, чем около 170 кДа, больше, чем около 180 кДа, больше, чем около 190 кДа, больше, чем около 200 кДа.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления проведение фильтрации белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, обогащает белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 5 раз. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления белок клетки-хозяина обогащают по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 25 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 35 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 45 раз, по меньшей мере около 50 раз, по меньшей мере около 55 раз, по меньшей мере около

60 раз, по меньшей мере около 65 раз, по меньшей мере около 70 раз, по меньшей мере около 75 раз, по меньшей мере около 80 раз, по меньшей мере около 85 раз, по меньшей мере около 90 раз, по меньшей мере около 95 раз, по меньшей мере около 100 раз, по меньшей мере около 105 раз, по меньшей мере около 110 раз, по меньшей мере около 115 раз, по меньшей мере около 120 раз, по меньшей мере около 125 раз, по меньшей мере около 130 раз, по меньшей мере около 135 раз, по меньшей мере около 140 раз, по меньшей мере около 145 раз, по меньшей мере около 150 раз, по меньшей мере около 155 раз, по меньшей мере около 160 раз, по меньшей мере около 165 раз, по меньшей мере около 170 раз, по меньшей мере около 175 раз, по меньшей мере около 180 раз, по меньшей мере около 185 раз, по меньшей мере около 190 раз, по меньшей мере около 195 раз или по меньшей мере около 200 раз.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ идентификации белка(ов) клетки-хозяина в матрице образца может включать проведение идентификации белка клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, источником ионов для масс-спектрометра может быть установка для инфузии электрораспылением. В некоторых других иллюстративных вариантах осуществления, масс-анализатор для масс-анализатора может быть выбран из времяпролетного (TOF), магнитного/электрического сектора, квадрупольного масс-фильтра (Q), квадрупольной ионной ловушки (QIT), орбитапа, ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FTICR), ускорительной масс-спектрометрии (AMS) или их комбинаций. В одном иллюстративном варианте осуществления установка для электрораспылительной инфузии может работать в режиме on-line с масс-спектрометром. Установка для инфузии с электрораспылением может включать излучатель электрораспыления, распылительный газ и/или источник питания ESI. Электрораспылитель может иметь наконечник для вливания с углеродным покрытием. Источник питания ESI может подавать положительное/отрицательное напряжение на покрытый углеродом инфузионный наконечник эмиттера электрораспылителя, в то время как отверстие для образца масс-спектрометра остается при 0 кВ, создавая интенсивное электростатическое поле между конечным образцом в эмиттере и заземленным отверстием масс-спектрометра и, следовательно, генерируя электроспрей. В одном иллюстративном варианте осуществления положительное напряжение может быть приложено к покрытому углеродом инфузионному наконечнику электрораспылительного эмиттера. Положительное напряжение, приложенное к покрытому углеродом инфузионному наконечнику электрораспылителя, может быть выбрано из около 0,5 кВ, около 1 кВ, около 1,4 кВ, около 2 кВ, около 3 кВ или около 4 кВ.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр может быть соединен с жидкостным хроматографом. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр может быть соединен с нано-жидкостным хроматографом. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления подвижная фаза, используемая для элюирования белка в жидкостной хроматографии, может быть

подвижной фазой, совместимой с масс-спектрометром. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления подвижная фаза может представлять собой ацетат аммония, бикарбонат аммония или формиат аммония, или их комбинации.

В другом иллюстративном варианте осуществления масс-спектрометр может содержать нанораспылитель.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр для характеристики белка.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления предел обнаружения способа может составлять по меньшей мере около 0,5 ч/млн. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах осуществления предел обнаружения может быть ниже, чем по меньшей мере около 0,5 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 1 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 2 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 3 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 4 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 5 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 10 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 20 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 30 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 40 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 50 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 60 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 70 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 80 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 90 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 100 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 150 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 200 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 250 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 300 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 350 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 400 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 450 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 500 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 550 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 600 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 650 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 700 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 750 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 800 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 850 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 900 ч/млн, ниже, чем по меньшей мере около 950 ч/млн или ниже, чем по меньшей мере около 1000 ч/млн.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления способ, включающий этапы фильтрации белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсежкой по молекулярной массе, может иметь по меньшей мере в около 5 раз более высокий предел обнаружения, чем способ, не включающий этап фильтрации белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсежкой по молекулярной массе. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах предел обнаружения может быть больше по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 25 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 35 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 45 раз, по меньшей мере около 50 раз, по меньшей мере около 55 раз, по меньшей мере около 60 раз, по меньшей мере около 65 раз, по меньшей мере около 70 раз, по меньшей мере около 75 раз, по меньшей мере около 80 раз, по меньшей мере около 85 раз, по меньшей мере около 90 раз, по меньшей мере около 95 раз, по меньшей мере около 100 раз, по меньшей мере около 105 раз, по меньшей мере



мере около 110 раз, по меньшей мере около 115 раз, по меньшей мере около 120 раз, по меньшей мере около 125 раз, по меньшей мере около 130 раз, по меньшей мере около 135 раз, по меньшей мере около 140 раз, по меньшей мере около 145 раз, по меньшей мере около 150 раз, по меньшей мере около 155 раз, по меньшей мере около 160 раз, по меньшей мере около 165 раз, по меньшей мере около 170 раз, по меньшей мере около 175 раз, по меньшей мере около 180 раз, по меньшей мере около 185 раз, по меньшей мере около 190 раз, по меньшей мере около 195 раз или по меньшей мере около 200 раз.

Следует понимать, что данное изобретение не ограничивается каким-либо из вышеуказанных белков клетки-хозяина, гидролизующих агентов, агентов, диссоциирующих белки, агентов, алкилирующих белки, инструментов, используемых для идентификации, и фильтров с отсечением по молекулярной массе, и что любой белок клетки-хозяина, гидролизующий агент, агент, диссоциирующий белок, агент, алкилирующий белок, инструмент, используемый для идентификации, и фильтр с отсечением по молекулярной массе, могут быть выбраны любым подходящим способом.

Последовательная маркировка этапов способов, предложенных в данном документе, номерами и/или буквами не подразумевает ограничения способа или каких-либо вариантов его осуществления конкретным указанным порядком.

В тексте описания цитируются различные публикации, включая патенты, патентные заявки, опубликованные патентные заявки, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из данных приведенных ссылок включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей.

Данное изобретение станет более понятно со ссылкой на следующие примеры, которые приведены для более подробного описания изобретения. Они предназначены для иллюстрации и не должны восприниматься как ограничивающие объем изобретения.

### **ПРИМЕРЫ**

**Материал.** Все химические вещества были высокой степени чистоты и получены из коммерческих источников. Хроматографические растворители класса ЖХ-МС были приобретены у Thermo Fisher Scientific. Моноклональное антитело (mAb1, далее) и белки СНО были произведены компанией Regeneron (Тарритаун, штат Нью-Йорк). Дезоксихолат натрия (SDC) и лауроилсаркозинат натрия (SLS), а также хлорацетамид (CAA) были приобретены у компании Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури). Трис-(2-карбокситил) фосфин (TCPEP) был приобретен у Thermo Fisher Scientific. Стандарт моноклонального антитела NIST RM 8670 был получен из Национального института стандартов и технологий.

**Подготовка образцов и расщепление белков.** Терапевтическое антитело солибилизовали в 100 мкл денатурирующего буфера, содержащего 12 мМ SDC и 12 мМ SLS в 100 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Денатурированные белки загружали в фильтр Amicon ultra-0,5, 50 кДа (Millipore sigma), затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 8 минут для получения обедненного антителами образца из пробирки. Образец, обедненный антителами, восстанавливали и алкилировали 10 мМ TCPEP и 40 мМ CAA при 95°C в

течение 5 мин. Алкилированные белки разбавляли до 5 раз 100 мМ Tris-HCl, pH8,0 и расщепляли в соотношении 1:20 (масс./масс.) фермент к белку в течение ночи при 37 °С. Расщепленные пептиды подкисляли трифторуксусной кислотой (TFA) до конечной концентрации 1% TFA, и 500 мкл этилацетата добавляли к 500 мкл расщепленного раствора. Смесь встряхивали в течение 2 мин, затем центрифугировали при 13200 об/мин в течение 2 мин для получения водной и органической фаз. Водная фаза была собрана и высушена с помощью концентратора speedvac. Высушенную пептидную смесь ресуспендировали в 0,1%-ной ТФА, затем обессоливали с помощью обессоливающего наконечника GL-Tip™ SDB (GL science, Япония).

**Прямое расщепление стандарта NIST.** 100 мкг стандарта NIST были высушены с помощью speedvac, затем повторно помещены в 20 мкл денатурирующего/восстанавливающего буфера, содержащего 8М мочевины и 10 мМ DTT. Белки денатурировали и восстанавливали при 37°С в течение 30 минут, а затем инкубировали с 6 мкл 50 мг/мл йодоацетамида в течение 30 минут в темноте. Алкилированные белки расщепляли с помощью 100 мкл 0,1 мг/мкл трипсина при 37°С в течение ночи. Смесь пептидов подкисляли 5 мкл 10% TFA. Образец разбавляли до 0,4 мг/мкл и вводили 2 мкл для ЖХ-МС/МС анализа.

**Анализ ЖХ-МС/МС.** Смесь пептидов растворяли в 10 мкл 0,1% муравьиной кислоты (FA) и вводили 8 мкл в ЖХ ultimate nano (Thermo Fisher Scientific). Пептиды разделяли на колонке 25 см (0,075 мм) C18 (2,0 мкм, 100 Å) (Thermo Fisher Scientific). Буфер подвижной фазы состоял из 0,1% FA в ультра-чистой воде (буфер А) и элюирующего буфера 0,1% FA в 80% ACN (буфер В), прогоняемого в течение 100 минут линейным градиентом 2%-25% буфера В при скорости потока 300 нл/мин. Масс-спектрометр Ultimate 3000 нано-ЖХ был соединен с масс-спектрометром Q-Exactive HFX (Thermo Fisher Scientific). Масс-спектрометр работал в режиме зависимости от данных, в котором 10 наиболее интенсивных ионов подвергались фрагментации методом высокоэнергетической коллизионной диссоциации (HCD) с нормированной энергией столкновения (NCE) 27%, AGC 3e6, максимальное время инъекции 60 мс) для каждого полного МС-сканирования (от m/z 375-1500 с разрешением 120000) и AGC 1e5, максимальное время инъекции 60 мс для событий МС/МС (от m/z 200-2000 с разрешением 30000).

**Анализ PRM.** Образцы растворяли в 8 мкл 0,1% муравьиной кислоты и 0,5-1 мкг образца вводили в систему Ultimate 3000 нано-ЖХ. Элюент вводили в масс-спектрометр с помощью 25 см колонки (0,075 мм) C18 (2,0 мкм, 100 Å). Буфер подвижной фазы состоит из 0,1% муравьиной кислоты в воде с элюирующим буфером из 0,1% муравьиной кислоты (буфер А) в 80% ACN (буфер В). Скорость потока ЖХ составляла 300 нл/мин. Градиент был задан как 2-25% буфера В для 100 минут линейного градиента. Образец был получен на приборе Q Exactive HFX (Thermo, Германия). Каждый образец анализировался в режиме параллельного мониторинга реакции (PRM) с окном выделения 2 m/z. Во всех экспериментах за полным масс-спектром с разрешением 120000 относительно m/z 200

(AGC мишень 1e6, максимальное время введения 60 мс, m/z 350-2000) следовало запланированное по времени сканирование PRM с разрешением 30000 (AGC мишень 1e5, максимальное время введения 100 мс). Была использована высокоэнергетическая коллизионная диссоциация (HCD) с нормированной энергией столкновения 27 эВ.

Терапевтические антитела - это относительно более крупные молекулы по сравнению с БКХ, имеющие молекулярную массу около 150 кДа, состоящие из двух частей полипептидной цепи. Схема разделения в соответствии с иллюстративным вариантом осуществления показана на фиг. 1. Буфер для коктейля из дезоксихолата натрия и лауроилсаркозината изначально использовался в основном для расщепления мембранных белков из-за его сильной растворимости для мембранных белков. (Takeshi Masuda, Masaru Tomita & Yasushi Ishihama, Phase Transfer Surfactant-Aided Trypsin Digestion for Membrane Proteome Analysis, 7 JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH 731-740 (2008)). Этот денатурирующий буфер был принят в данном способе не только потому, что он является сильным денатуратором, но и потому, что его легко удалить перед МС-анализом. Однако могут быть использованы и другие денатураты. При применении фильтрации после денатурации большая часть антител не пройдет через мембрану фильтра, в то время как большая часть БКХ свободно пройдет через мембрану благодаря их меньшему размеру. Таким образом, денатурированное антитело и связанные с ним БКХ были разделены на основе их молекулярного размера.

#### **Пример 1.**

Эффективность фильтрации выбранного денатуратора сравнивали с мочевиной в 5% уксусной кислоте, наиболее часто используемым условием денатурации. До и после фильтрации общее количество белка измеряли с помощью Nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Когда 1,5 мг образца антитела пропустили через отсекающий фильтр MM 100T с 8M мочевиной в 5% уксусной кислоте, конечное количество пептидов составило 150 мкг без значительного улучшения общего количества идентифицированного белка. При использовании мочевины в качестве денатуратора сложность образца не была значительно уменьшена, и белок был удален только на 90%. Учитывая, что общее количество БКХ было менее 100 ч/млн, относительный уровень антител все равно был, по меньшей мере, на 3 порядка выше, чем общее количество БКХ. Напротив, денатуратор-коктейль SDC+SLS, значительно повысил эффективность фильтрации. После фильтрации с помощью SDC+SLS количество образца уменьшилось до 4 мкг, а количество идентифицированных белков увеличилось до 26 (Таблица 1). Если предположить, что все антитела могут быть удалены путем фильтрации, то оставшиеся белки будут только БКХ, и их количество должно составлять приблизительно 0,15 мкг. Результаты показали, что для данного конкретного антитела все еще существует значительное количество mAb, которое проходит через мембрану, отсекающую MM 100T, поэтому необходима оптимизация для дальнейшего уменьшения обхода mAb.

#### **Таблица 1.**

	<b>Буфер для денатурирования</b>	<b>Величина загрузки DS</b>	<b>Конечное количество пептида</b>	<b>Общий идентификатор</b>	<b>Соответствие результату IP (подтверждено)</b>	<b>Высоко достоверный белок № (&gt;2 пептидов)</b>
1	8M мочевины в 5% УК	1,5 мг	150 мкг	83	3	10
2	SDC+SLS	1,5 мг	4 мкг	124	10	26

### Пример 2.

Фильтр с размером отсеки по ММ 50Т был оценен для ограничения выхода mAb из фильтра. Кроме того, было оценено влияние скорости центрифугирования (13000, 7000 об/мин) на фильтрационное разделение. Результаты влияния этих двух факторов при четырех условиях в целом показаны в таблице 2. При скорости вращения 13000 об/мин использовалось 8 минут, а при 7000 об/мин - 15 минут, чтобы конечный раствор образцов достиг одинакового объема. Общее количество образца значительно уменьшилось с 1,5 мг до менее чем 16 мкг после фильтрации для всех четырех условий, что указывает на около 100-кратное удаление образца путем фильтрации. Для используемого антитела mAb1, по сравнению с фильтром 100Т, фильтр 50Т блокировал значительно большее количество антитела с конечным количеством пептида менее 1 мкг. Фильтр 50Т с 13000 об/мин в течение 8 минут был наилучшим условием, которое привело к наибольшей общей идентификации белка с высокой степенью достоверности (Таблица 2).

**Таблица 2.**

	<b>Буфер для денатурирования</b>	<b>Фильтр</b>	<b>Скорость (об/мин)</b>	<b>Время (мин)</b>	<b>Конечное количество пептида</b>	<b>Общий идентификатор</b>	<b>Соответствие результату IP (подтверждено)</b>	<b>Высоко достоверный белок № (&gt;2 пептидов)</b>
1	SDC+SLS	100K	13000	8	8,6 мкг	135	7	34
2	SDC+SLS	100K	7000	15	16 мкг	129	5	23
3	SDC+SLS	50K	13000	8	0,68 мкг	173	10	61
4	SDC+SLS	50K	7000	15	0,56 мкг	156	10	52

Для фильтрации, проведенной с использованием фильтра 50T при 13000 об/мин в течение 8 минут, фиг. 2 и 3 продемонстрировали суммарную ионную хроматографию образца до и после фильтрации, соответственно. При одинаковом количестве вводимого образца после фильтрации, масс-спектры отфильтрованного образца были намного чище, чем до фильтрации (фиг. 2 и 3), что свидетельствует о резком уменьшении образца. Уменьшение образца также можно увидеть по ХИС профилю отдельного пика антитела. Например, по сравнению с образцом, обработанным фильтрацией, ХИС пика с  $m/z$  546,60<sup>3+</sup> без фильтрации показал значительное уменьшение удержания вершины с типичной правосторонней формой «акулий плавник», что указывает на значительную перегрузку образца (фиг. 4). Следует отметить, что общее количество инъекций примерно одинаково, следовательно, именно антитело в образце резко уменьшено методом фильтрации, что привело к получению образца с относительно меньшим количеством антитела, но большим количеством БКХ. Таким образом, идентификация БКХ была значительно улучшена.

### **Пример 3.**

Чтобы оценить точную величину уменьшения образца или инверсного обогащения БКХ, происходящего в процессе фильтрации, был проведен параллельный мониторинг реакций (PRM) с использованием таргетингового МС подхода для расчета коэффициента обогащения БКХ методом фильтрации. Сравнивая относительное содержание отдельных пептидов БКХ по сравнению с пептидами антитела (для mAb1) до и после фильтрации, можно рассчитать коэффициент обогащения БКХ. На фиг. 5 показано изменение сигнала PRM одного пептида БКХ, LAYINPDLAEEK. Наблюдалось более чем 100-кратное увеличение сигнала, причем относительное содержание увеличилось с 14 до 1628 ч/млн при отфильтровывании антитела (фиг. 5). Благодаря удалению большей части антител с помощью фильтра, диапазон концентраций отфильтрованного раствора значительно уменьшается, так что относительная концентрация БКХ становится намного выше, что заметно при последующем МС-анализе.

### **Пример 4.**

Для оценки предела обнаружения метода определения БКХ был проведен эксперимент с предельного количества. Двенадцать (12) белков, включая 11 белков СНО и 1 человеческий белок с различной концентрацией от 0,1 до 200 ч/млн, были добавлены к одному очищенному моноклональному антителу (mAb1) с очень низким уровнем БКХ. Поскольку проводилась оценка влияния размера отсекающего по ММ фильтра, 12 выбранных белков различались не только по концентрации, но и по молекулярной массе/размеру, варьируя от 14,6 кДа до 86,5 кДа (Таблица 3). Результаты показали, что размер действительно имеет значение, когда применяется фильтрация с отсечкой по ММ. PLBD2 и PCSK9 человека являются белками с размером 65,5 и 74,3 кДа, соответственно, что значительно превышает 50 кДа. После фильтрации с отсечкой 50 кДа оба белка не были обнаружены. Однако, если количество более крупной молекулы, например, глутатион-S-трансферазы Ми6 (86,5 кДа) было очень велико, белок мог пройти через

фильтр, несмотря на более высокую, чем отсекаемая молекулярную массу. Это также может объяснить, почему антитело всегда может пережить блокаду фильтра. При низком уровне добавленных белков, 0,5 ч/млн кислой церамидазы обеспечили 4 уникальных пептида, в то время как для ч/млн транстиретина был обнаружен только 1 уникальный пептид. Как правило, в шотган-протеомном анализе, чем меньше размер белка, тем меньше шансов быть обнаруженным, поскольку белки с малым размером генерируют гораздо меньше пептидов, чем более крупные белки. Другая причина такой высокой достоверности идентификации может быть связана с высокой эффективностью ионизации некоторых специфических триптических пептидов из кислой церамидазы. Тем не менее, метод идентификации БКХ показывает, что предел обнаружения метода фильтрации находится в диапазоне от 0,5 до 1 ч/млн.

Таблица 3.

Добавлен ые ч/млн	Название белка	Uniprot, № доступа	Кол-во пептидов	Кол-во PSM	Кол-во уникаль ных пептидов	ММ [кДа]
200	Глутатион-S- трансфераза Миб	G3IKC3	7	19	7	86,5
100	Аннексин А1	G3I5L3	10	41	10	38,8
50	Тяжелый PLBD2	G3I6T1	0	0	0	65,5
20	Катепсин Z	G3I4W7	14	200	14	44,1
10	TIMP1	G3IBH0	2	12	2	22,4
10	Антилейкопротеин аза	G3HLT0	7	89	7	14,6
5	мотив хемокина С- Х-С	A4URF0	4	47	4	39,7
5	Лизосомальная кислая липаза хомьяка	G3HQY6	1	2	1	45,6
1	PLBD2	G3I6T1	0	0	0	65,5
1	Транстиретин	G3I4M9	1	3	1	15,8
0,5	Кислотная церамидаза	G3GZB2	4	12	4	44,7
0,1	PCSK9 человека	Q8NBP7	0	0	0	74,3

**Пример 4.**

Для оценки воспроизводимости данного метода был проведен дублирующий

эксперимент с использованием стандарта NIST. В общей сложности, 326 белков, эквивалентных 97% белков, и 1118 пептидов, эквивалентных 94% пептидов, были идентифицированы в обоих прогонах, соответственно (фиг. 6). Высокая повторяемость результатов также свидетельствует о высокой уверенности в идентификации белков, что имеет решающее значение при исследовании БКХ. Для количественного определения относительного количества каждого пептида в обоих пробах была проведена безметочная количественная оценка, корреляция Пирсона составила более 0,97, что свидетельствует о высокой воспроизводимости метода с незначительными отклонениями (фиг. 7).

### Пример 5.

Для характеристики БКХ в конкретных биофармацевтических продуктах было опубликовано множество мощных подходов на основе масс-спектрометрии, которые недоступны для других исследователей, поэтому прямое сравнение результатов различных методов практически невозможно. Недавно, как Doneanu et al. (выше), так и Huang et al. (выше) применили свой метод на стандарте антител NIST RM 8670 и выявили 14 и 59 высокодостоверных БКХ, соответственно. Для облегчения прямого сравнения был проведен метод идентификации БКХ для характеристики БКХ в стандарте NIST RM 8670. 164 мышинных белка были идентифицированы с высокой степенью достоверности (более 2 пептидов) и коэффициентом ложных срабатываний  $\leq 0,01$ . Как показано на фиг. 8, 13 из 14 и 45 из 59 БКХ, которые были обнаружены Doneanu et al. (выше) и Huang et al. (выше), соответственно, были определены. Неидентифицированные этими методами белки - это либо белки с молекулярной массой более 50 кДа, либо неоднозначные мишени с низким содержанием (табл. 4). В целом, 119 мышинных БКХ в стандарте антител NIST, выявленных методом идентификации БКХ, не были зарегистрированы в предыдущих двух исследованиях. Среди них 38 из 119 белков содержат более 5 уникальных пептидов, а 90 -  $\geq 3$  пептидов.

Таблица 4.

№ доступа	описание	размер	уникальный пептид	ин. №			Среднее
				1	2	3	
Q8C7U7	полипептид N-ацетилгалактозаминилтрансферазы 6	71,9	10	5	7	6	6
Q62179	семафорин-4В	91,4	7	5	10	5	6
Q6PB93	полипептид N-ацетилгалактозаминилтрансферазы 2	64,5	7	3	3	3	3
P40124	аденилилциклаза-ассоциированный белок 1	51,6	4	0,8	0,8	0,8	0,8

P11680	пропердин	50,3	3	1	2	1	2
Q8BND 5	сульфгидрильная оксидаза 1	82,8	3	2	2	2	2
Q9QUR 8	семафорин-7А	75	2	1	1	1	1
P09041	фосфоглицерат киназа 2	44,9	2	1	1	1	1
P03975	IgE-связывающий белок	62,8	2	1	1	1	1
Q9CQF3	субъединица 5 фактора специфичности расщепления и полиаденилирования	26,2	2	1	1	1	1
P34902	общая субъединица гамма рецептора цитокинов	42,2	2	1	1	<0,5	1
Q6PDM 2	серин/аргинин-богатый фактор сплайсинга 1	27,7	2	<0,5	<0,5	1	<0,5
Q6PGH2	гематологический и неврологический экспрессированный 1-подобный белок	20	2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
P19157	глутатион-S-трансфераза Р	23,6	2	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

### Пример 6.

Валидация известных и новых БКХ в NIST была проведена методом параллельного мониторинга реакций.

Для проверки целей, найденных методом идентификации БКХ, 27 идентифицированных БКХ NIST были случайным образом отобраны для проведения PRM-анализа. Сравнивая пептидные сигналы этих БКХ до и после фильтрационной обработки, была проведена валидация этих белков с улучшением эффективности данного метода. Все выбранные мишени были обогащены от 2 до 120 раз методом идентификации БКХ (Таблица 5 и 6). В таблице 5 перечислены цели, которые были определены в двух других исследованиях. 70% выбранных мишеней были измерены на уровне выше 1 ч/млн в образце прямого расщепления, что соответствует результатам Huang et al. (выше), в котором было обнаружено, что более 80% целей превышают 1 ч/млн. В таблице 6 перечислены новые мишени, которые были обнаружены только методом идентификации БКХ. Результаты наглядно продемонстрировали резко возросшую эффективность. Большинство измеренных белков до фильтрационной обработки были ниже 0,5 ч/млн. Однако после фильтрации относительная концентрация белков увеличилась настолько, что их можно было легко обнаружить. Улучшение эффективности для этих белков с



низкой численностью очень заметно: большинство из них улучшились более чем в 100 раз, а некоторые - в 1000 раз. Тот факт, что гораздо большее количество идентифицированных целей с низкой численностью, говорит о важности ключевого фактора в этом методе: уменьшение динамического диапазона. Динамический диапазон, образованный антителом и связанными с ним БКХ, был уменьшен на 3 порядка, примерно с 8 до 5 порядков, что привело к увеличению сигнала БКХ.

Приведенные выше примеры представляют простой и мощный метод идентификации БКХ в матрице образца, содержащего представляющий интерес белок, путем применения одного единственного шага фильтрации с отсечением по молекулярной массе с последующим применением основных протеомных подходов, таких как, например, шотган-протеомика. Этот способ может быть успешно использована для удаления большинства интересующих белков в матрице образца, что значительно сокращает динамический диапазон в матрице образца и приводит к более эффективному обнаружению малочисленных БКХ.

**Таблица 5.**

<b>№ доступа</b>	<b>Название белка</b>	<b>Прямое расщепление (ч/млн)</b>	<b>Обработка фильтром (ч/млн)</b>
P08101	низкоаффинный рецептор II Fc-области иммуноглобулина гамма	56,5	456
P01887	Бета-2-микроглобулин	44,97	4214,69
P05063	Фруктозо-бисфосфатная альдолаза С	82,87	1265,41
P05064	Фруктозо-бисфосфатная альдолаза А	366,63	2023,93
P10126	Фактор элонгации 1-альфа 1	4,8	51,4
P32020	Неспецифический липид-переносящий белок	0,98	137,10
P35700	Пероксиредоксин-1	0,64	27,6
P53996	Клеточный белок, связывающий нуклеиновые кислоты	0,58	60,04
P99029	Пероксиредоксин-5, митохондриальный	2,59	122,41

Q60864	Стресс-индуцированный фосфопротеин 1	14,64	1627,93
Q8BL97	серин/аргинин-богатый фактор сплайсинга 7	8,05	783,78
Q8CGC7	Бифункциональная глутамат/пролин-тРНК лигаза	0,53	13,17
Q91YR9	Простагландин редуктаза 1	4,65	53,05
Q922R8	Белковая дисульфид-изомераза A6	12,69	25,53
Q923D2	Флавин редуктаза	3,37	145,17
Q9D8B3	Заряженный белок мультивезикулярного тела 4b	0,12	31,62
Q9Z0X1	Индукцирующий апоптоз фактор 1, митохондриальный	2,34	63,62

Таблица 6.

№ доступа	Название белка	Прямое расщепление (ч/млн)	Обработка фильтром (ч/млн)	Повышенная эффективность
O08583	Субъединица 4 комплекса ТНО	8,02	1716,65	214
P14152	Малатдегидрогеназа, цитоплазматическая	0,28	124,66	445
P16858	Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа	0,32	52,3	163
P52480	Пируваткиназа РКМ	0,02	9,35	468
P60335	Поли(гС)-связывающий белок 1	5,33	161,00	30

Q05816	Связывающий жирные кислоты белок 5	0,10	10,94	109
Q80U87	Убиквитин карбоксил-терминальная гидролаза 8	0,01	13,34	1334
Q9DB15	39S рибосомальный белок L12, митохондриальный	0,34	74,10	218
Q9CR16	Пептидил-пролил цис-транс-изомераза D	0,37	105	284
Q9CZY3	Убиквитин-конъюгирующий фермент E2 вариант 1	8,4	66,7	8

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащего представляющий интерес белок, включающий:
  - проведение диссоциации белка клетки-хозяина от представляющего интерес белка;
  - проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе;
  - приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом; и
  - идентификацию белка клетки-хозяина.
2. Способ по п. 1, в котором диссоциацию белка осуществляют с помощью агента, диссоциирующего белок.
3. Способ по п. 1, дополнительно включающий приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с агентом, восстанавливающим белок.
4. Способ по п. 1, дополнительно включающий приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с агентом, алкилирующим белок.
5. Способ по п. 1, дополнительно включающий центрифугирование отфильтрованного белка клетки-хозяина.
6. Способ по п. 1, дополнительно включающий центрифугирование белка клетки-хозяина при скорости около 13000 об/мин в течение около 8 минут.
7. Способ по п. 1, в котором представляющий интерес белок представляет собой антитело.
8. Способ по п. 1, в котором представляющий интерес белок представляет собой терапевтическое антитело.
9. Способ по п. 1, в котором идентификацию белка клетки-хозяина на этапе (с) осуществляют с помощью масс-спектрометра.
10. Способ по п. 9, в котором масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.
11. Способ по п. 10, в котором система жидкостной хроматографии представляет собой систему нано-жидкостной хроматографии.
12. Способ по п. 9, в котором масс-спектрометр представляет собой tandemный масс-спектрометр.
13. Способ по п. 2, в котором агент, диссоциирующий белок, содержит дезоксихолат натрия.
14. Способ по п. 2, в котором агент, диссоциирующий белок, содержит N-лауроилсаркозин.
15. Способ по п. 1, в котором агент, гидролизующий белок, представляет собой трипсин.
16. Способ по п. 3, в котором агент, восстанавливающий белок, представляет собой TSEP.

17. Способ по п. 4, в котором агент, алкилирующий белок, представляет собой САА.

18. Способ по п. 1, в котором фильтр с отсечкой по молекулярной массе имеет отсечку около 100 кДа.

19. Способ по п. 1, в котором фильтр с отсечкой по молекулярной массе имеет отсечку около 50 кДа.

20. Способ по п. 1, в котором агент, диссоциирующий белок, является деградируемым.

21. Способ по п. 1, в котором предел обнаружения белка клетки-хозяина составляет по меньшей мере около 1 ч/млн.

22. Способ по п. 1, в котором этап фильтрации обогащает диссоциированный белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 50 раз.

23. Способ по пункту 1, в котором предел обнаружения белка клетки-хозяина по меньшей мере в около 5 раз превышает предел обнаружения другого способа, не включающего этап фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе.

24. Способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащего представляющий интерес белок, включающий:

проведение диссоциации белка клетки-хозяина от представляющего интерес белка; проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе; и идентификацию белка клетки-хозяина.

25. Способ по п. 25, в котором этап фильтрации обогащает диссоциированный белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 50 раз.

26. Способ по п. 25, в котором идентификацию белка клетки-хозяина осуществляют с помощью масс-спектрометра.

27. Способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащего представляющий интерес белок, включающий:

проведение диссоциации белка клетки-хозяина от представляющего интерес белка с помощью агента, диссоциирующего белок;

проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе; и идентификацию белка клетки-хозяина.

28. Способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащего представляющий интерес белок, включающий:

проведение диссоциации белка клетки-хозяина от представляющего интерес белка с помощью агента, диссоциирующего белок;

проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе; и идентификацию белка клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

29. Способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащего представляющий интерес белок, включающий:

проведение диссоциации белка клетки-хозяина от представляющего интерес белка с помощью агента, диссоциирующего белок;

проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, причем фильтрация обогащает диссоциированный белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 50 раз; и идентификацию белка клетки-хозяина.

30. Способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащего представляющий интерес белок, включающий:

проведение диссоциации белка клетки-хозяина от представляющего интерес белка с помощью агента, диссоциирующего белок;

проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, причем фильтрация обогащает диссоциированный белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 50 раз; и идентификацию белка клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

31. Способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, содержащего представляющий интерес белок, включающий:

проведение диссоциации белка клетки-хозяина от представляющего интерес белка с помощью агента, диссоциирующего белок;

проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе, причем фильтрация обогащает диссоциированный белок клетки-хозяина по меньшей мере в около 50 раз;

приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом; и идентификацию белка клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

32. Способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, включающий:

приведение в контакт матрицы образца, содержащей белок клетки-хозяина, с агентом, диссоциирующим белок;

проведение фильтрации диссоциированного белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе;

приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом; и идентификацию белка клетки-хозяина.

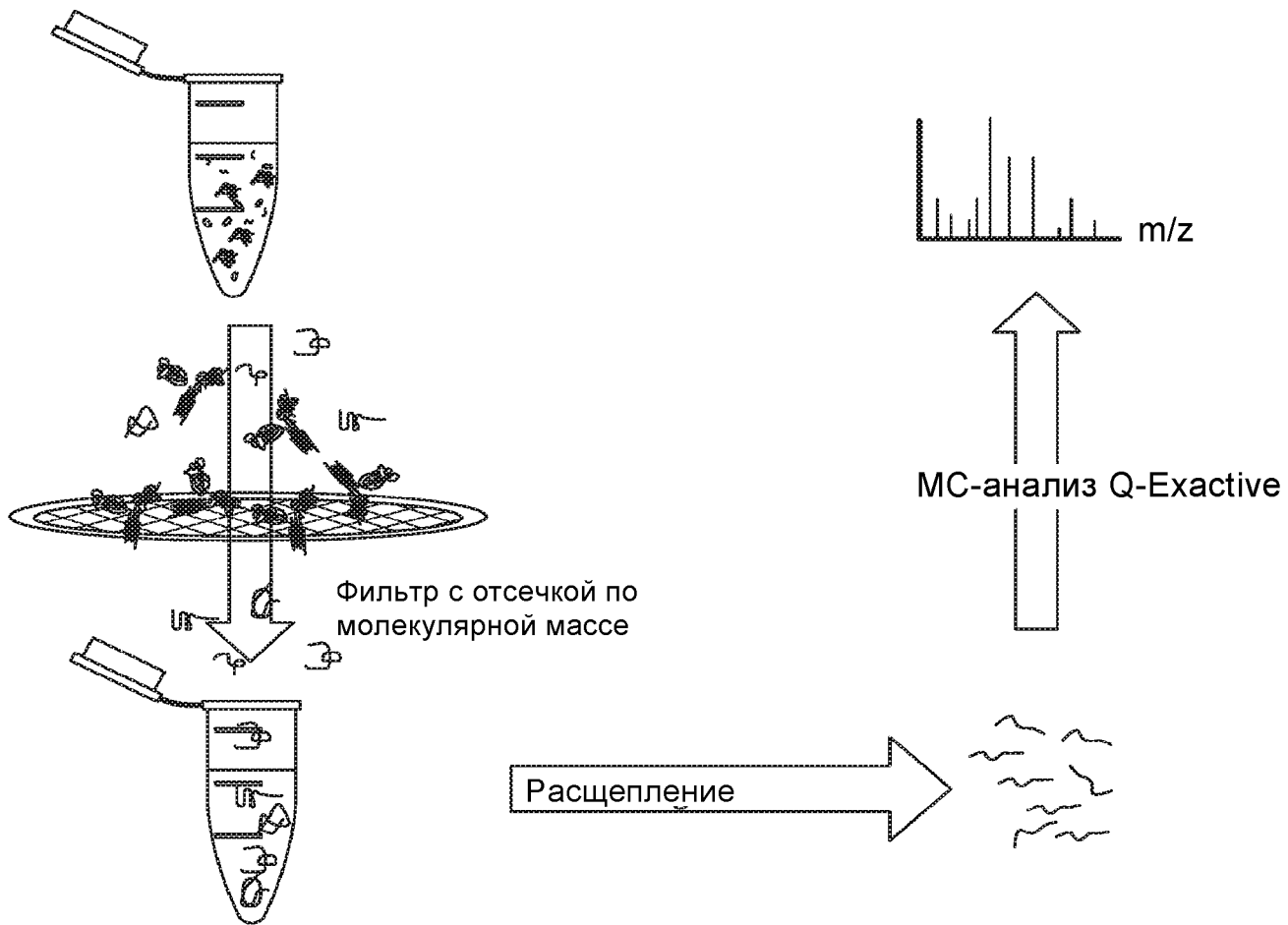
33. Способ идентификации белка клетки-хозяина в матрице образца, включающий:

приведение в контакт матрицы образца, содержащей белок клетки-хозяина и представляющий интерес белок, с агентом, диссоциирующим белок, при этом агент, диссоциирующий белок, денатурирует представляющий интерес белок;

проведение фильтрации белка клетки-хозяина с помощью фильтра с отсечкой по молекулярной массе;

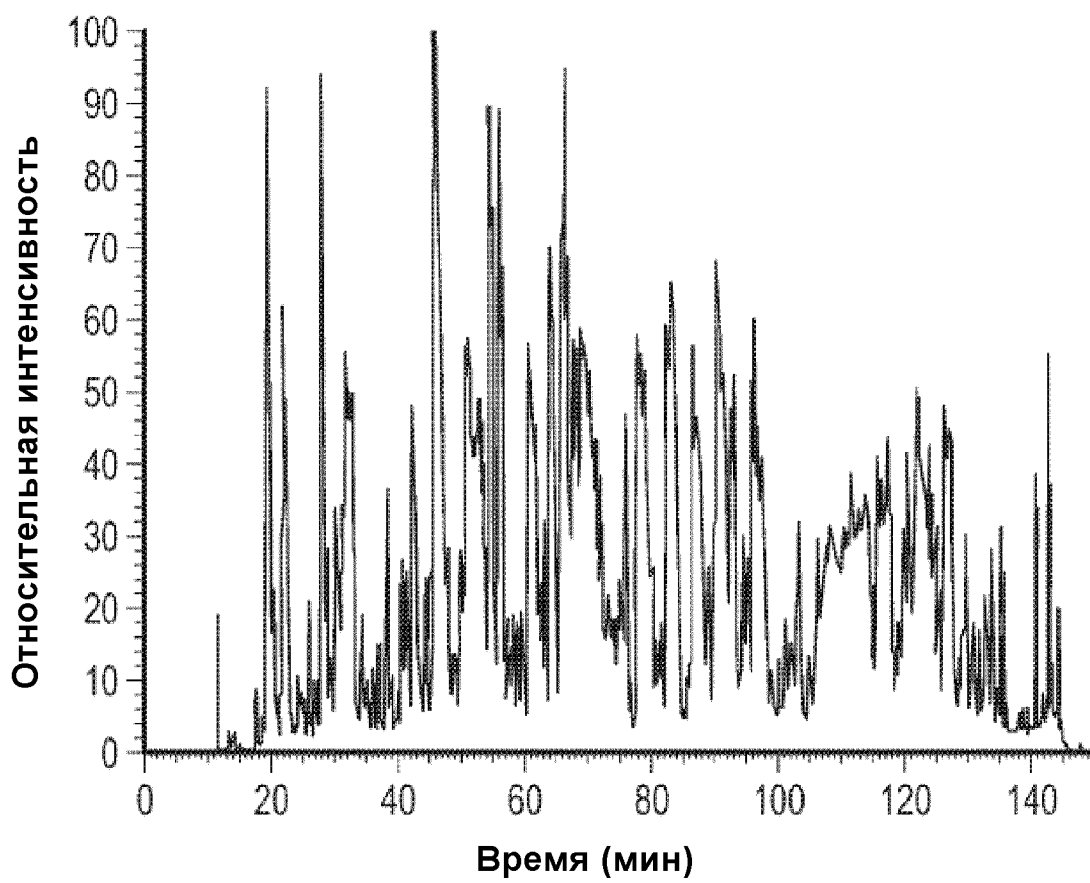
приведение в контакт отфильтрованного белка клетки-хозяина с гидролизующим агентом; и  
идентификацию белка клетки-хозяина.

По доверенности

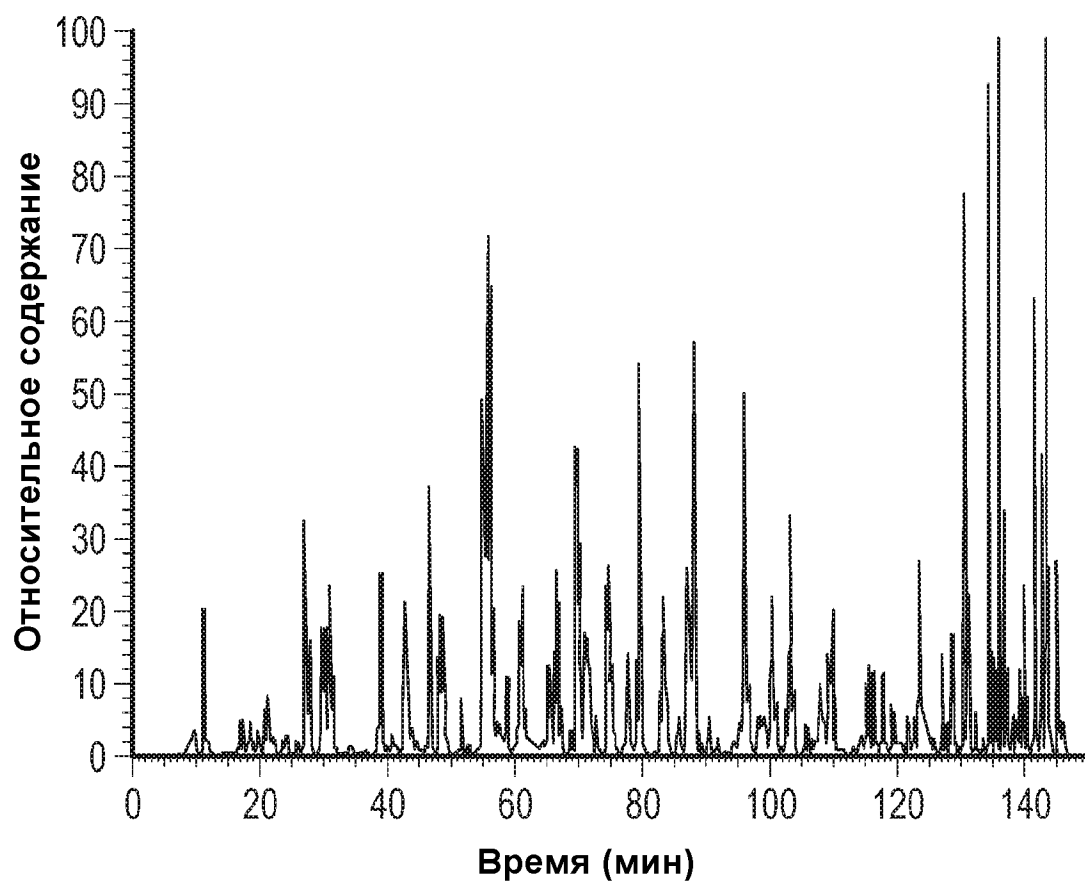


ФИГ. 1

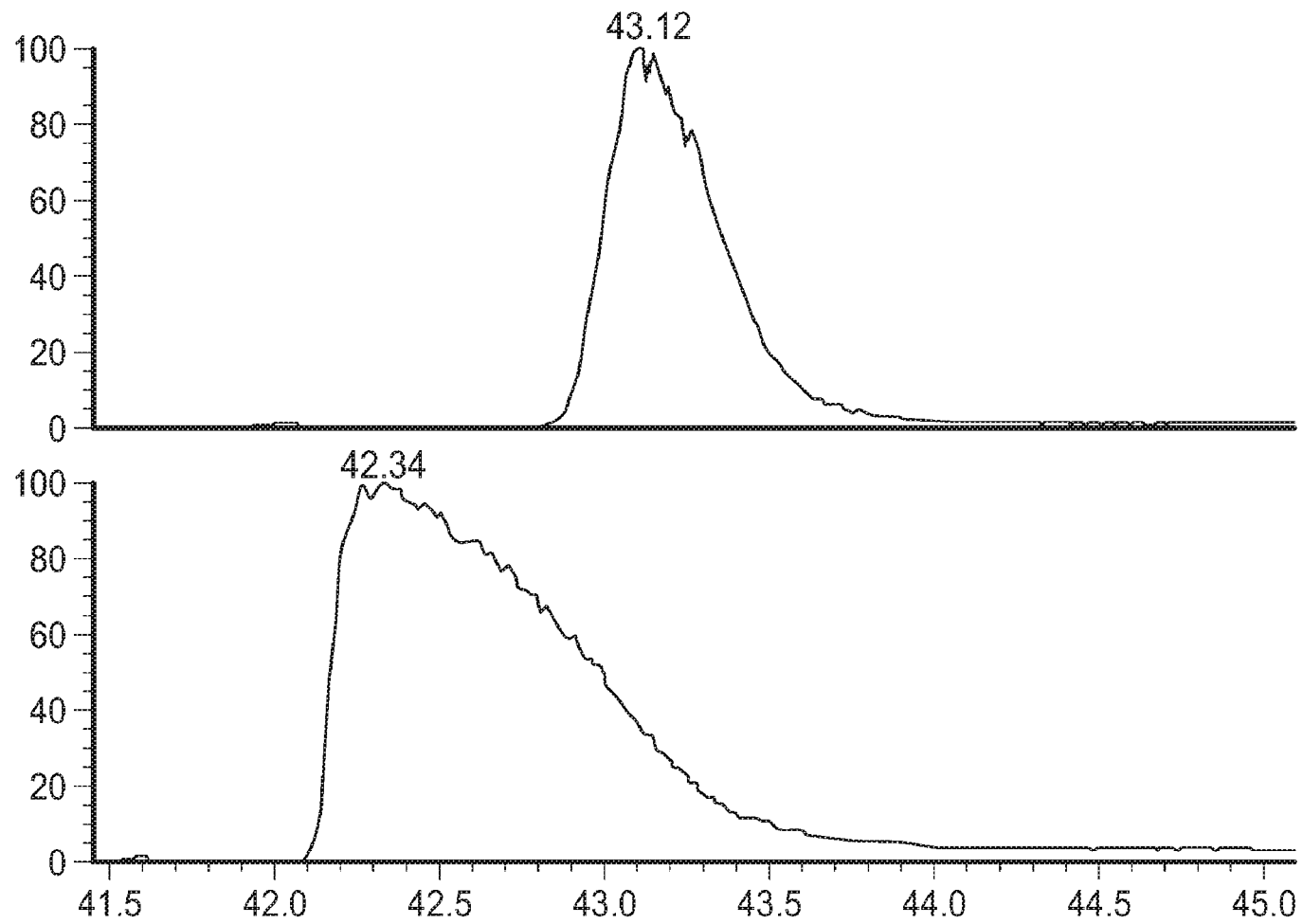




ФИГ. 2

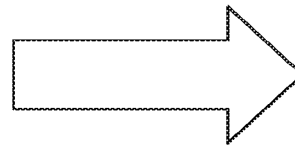
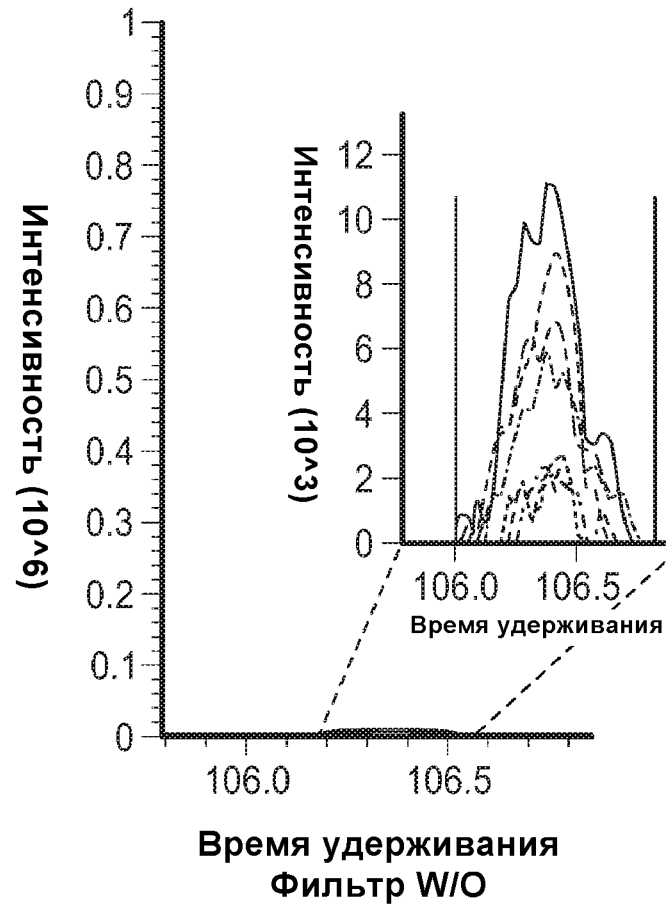


ФИГ. 3

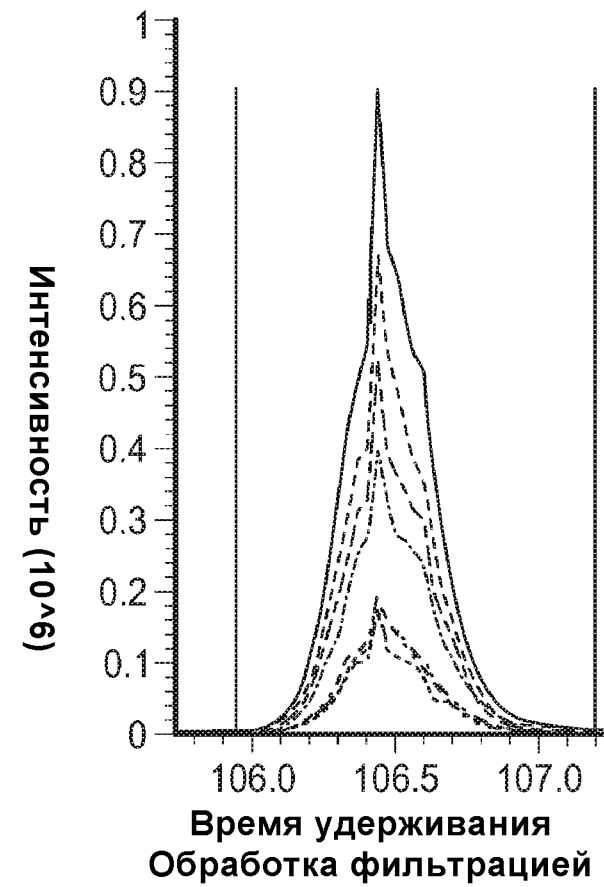


ФИГ. 4

14 ч/млн  
LAYINPDLAEEK

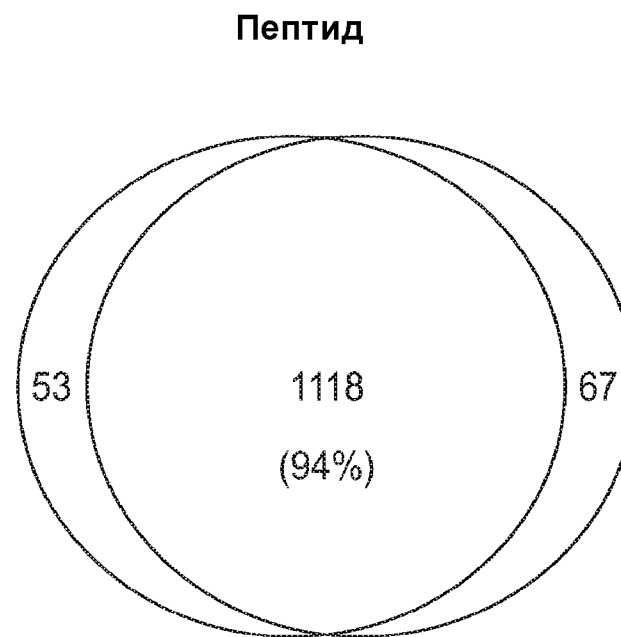
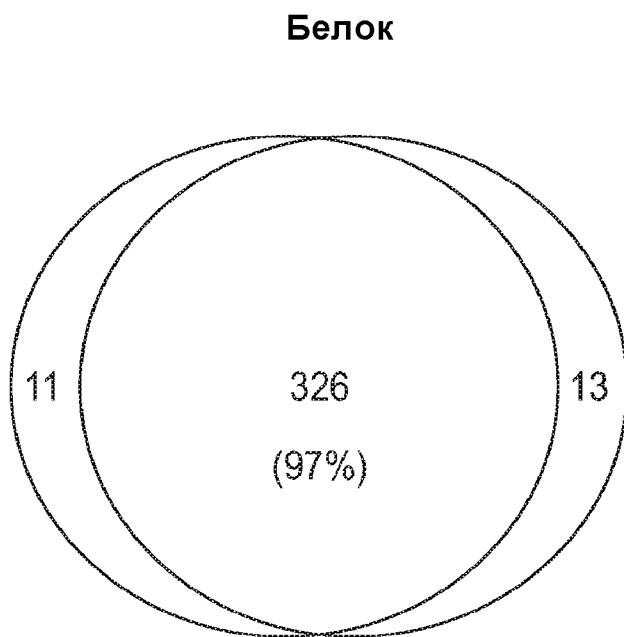


1628 ч/млн  
LAYINPDLAEEK

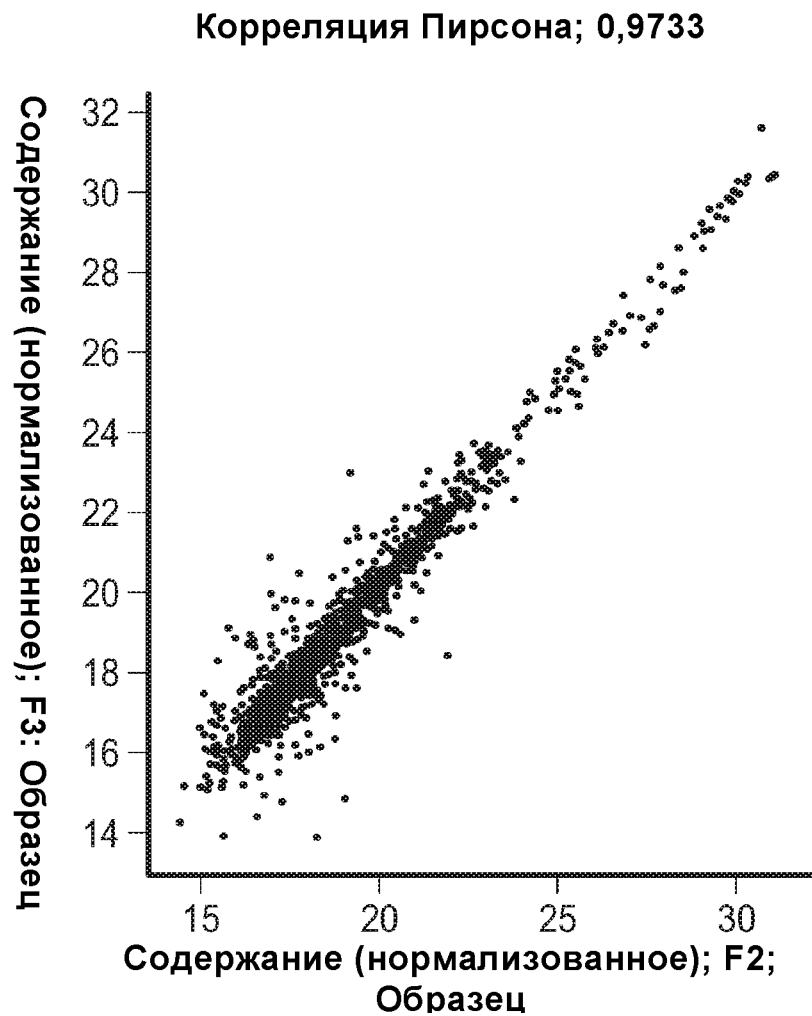
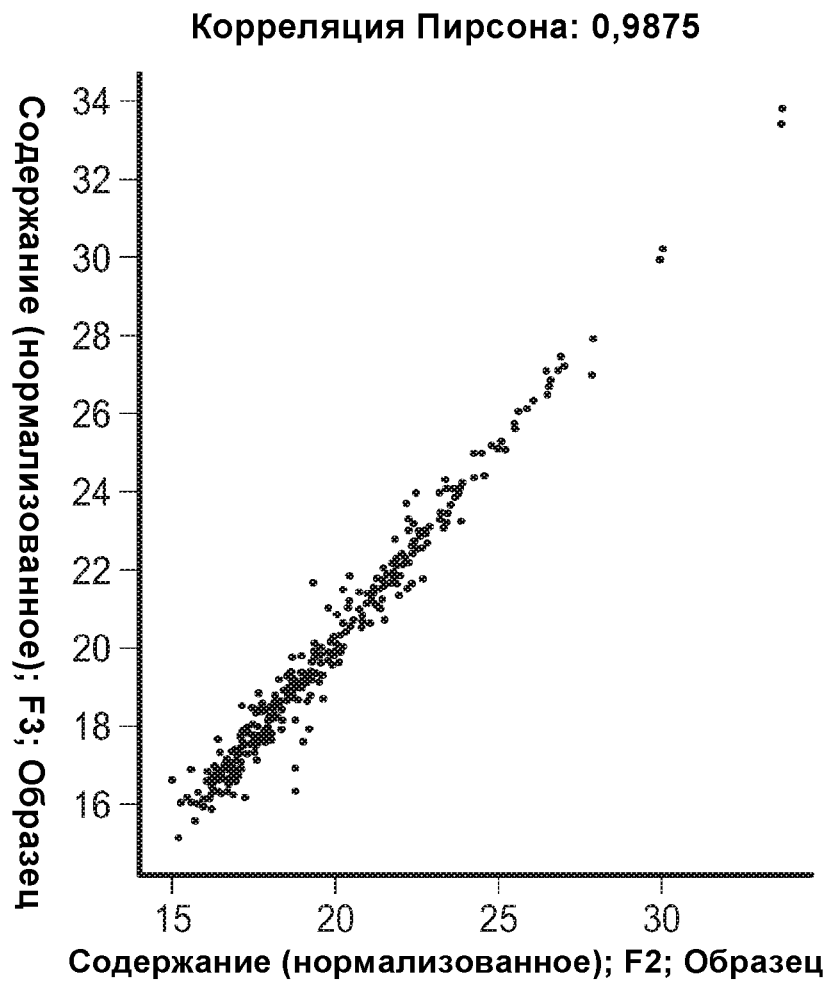


5/8

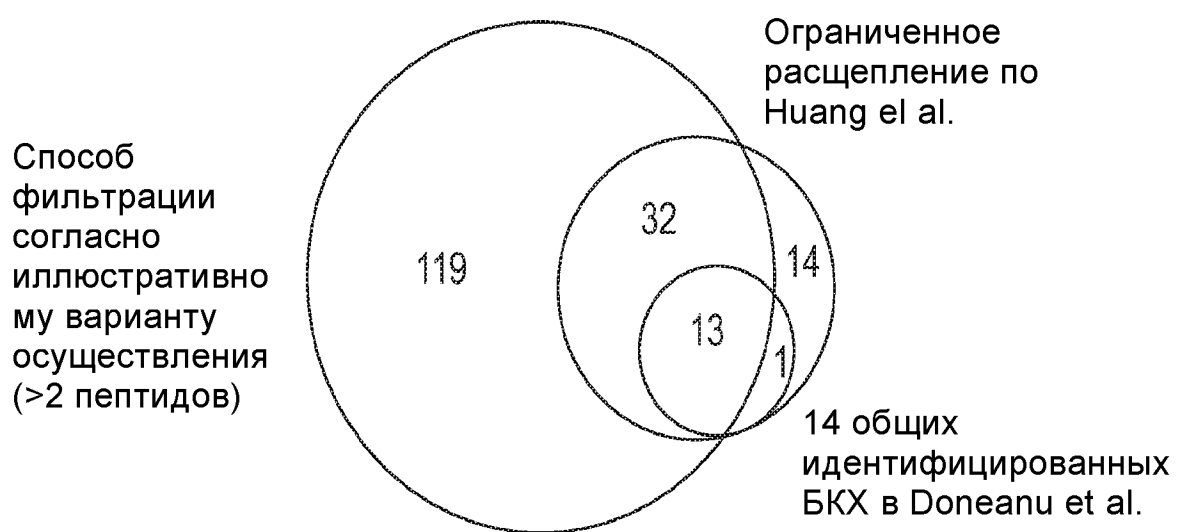
ФИГ. 5



**ФИГ. 6**



ФИГ. 7



ФИГ. 8