(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291110 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.09.16

(22) Дата подачи заявки
2020.10.09

(51) Int. Cl. ***G01N 27/447*** (2006.01)
G01N 27/622 (2021.01)

(54) СПОСОБЫ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (ЖХ-МС) ДЛЯ АНАЛИЗА ВАРИАЦИИ ПАРТИИ АМФОЛИТА

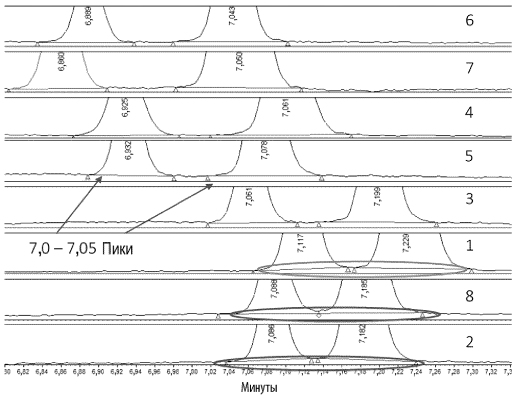
(31) **62/913,450**
(32) **2019.10.10**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/055031**
(87) **WO 2021/072230 2021.04.15**

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

(72) Изобретатель:
Маллен Рэйчел, Райан Клэр, О'Коннор Симус, Хелминг Стейси (US)

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

(57) Данное изобретение относится к способам определения характеристик амфолитных композиций, подходящих для последующих применений, таких как капиллярное изоэлектрическое фокусирование с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии.



202291110 A1

202291110 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573874EA/061

СПОСОБЫ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (ЖХ-МС) ДЛЯ АНАЛИЗА ВАРИАЦИИ ПАРТИИ АМФОЛИТА

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США № 62/913,450, поданной 10 октября 2019 г., содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] Данное изобретение относится к способам определения характеристик белковых композиций по заряду и определения характеристик амфолитных композиций с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Многие белки подвергаются вторичным модификациям, которые приводят к разновидностям заряда белка, таким как дезамидирование, образование N-концевого пироглутамата, агрегация, изомеризация, сиалированные гликаны, фрагментация и гликирование остатков лизина. В некоторых случаях эти вторичные модификации и возникающие на их основании разновидности заряда могут влиять на связывание, биологическую активность, безопасность для пациента и срок годности белка. Для анализа заряда белков можно использовать инструменты, такие как гель-электрофорез с изоэлектрическим фокусированием (IEF; isoelectric-focusing gel electrophoresis), и капиллярные эквиваленты, такие как капиллярное изоэлектрическое фокусирование (CIEF; capillary isoelectric focusing) и CIEF с визуализацией (iCIEF; imaged CIEF). Эти методы важны для определения характеристик и мониторинга качества, чистоты, стабильности и изменчивости терапевтических белков, таких как лекарственные препараты на белковой основе и лекарственные вещества. Один из таких методов, iCIEF, значительно содействовал разработке биофармацевтики благодаря его высокому разрешению, минимальному времени разработки, уменьшенному объему образца и коротким отрезкам времени циклов. Эти преимущества обеспечивают их применение во всех фармацевтических процессах, от разработки и оптимизации клеточных культур до коммерческих видов деятельности по выпуску с контролем качества (QC; quality control) и по обеспечению стабильности.

[4] В CIEF и iCIEF разделение белков с разными суммарными зарядами достигается путем фокусировки белков в амфолитическом градиенте pH с помощью примененного электрического поля, разделения изоформ на основании внутреннего изоэлектрического заряда. Этот метод разделения основан на использовании амфолитов для создания градиента pH при воздействии электрического потенциала. Затем белковые частицы мигрируют в разные области капилляра в зависимости от их изоэлектрической точки или значения pI. Однако различие амфолитных композиций, используемых для создания градиента pH в этих способах, в зависимости от партии может влиять на

результаты анализа. Предыдущие способы определения характеристик амфолитных композиций на предмет их пригодности для iCIEF и аналогичных методов основывались на непрямых способах, таких как использование амфолитных композиций для получения электрофореграмм iCIEF или аналогичных показаний эталонного белка и сравнение полученных электрофореграмм, полученных с помощью различных амфолитных композиций. Однако эти способы являются дорогостоящими, требуют много времени и используют большое количество белка. Таким образом, в данной области техники существует потребность в усовершенствованных способах характеристики амфолитных композиций для их пригодности в таких способах, как iCIEF. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, обеспечивая усовершенствованные способы прямого анализа амфолитных композиций.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[5] В данном изобретении обеспечены способы идентификации тестируемой амфолитной композиции с подходящей активностью, включающие: (a) идентификацию по меньшей мере одного маркера по меньшей мере в одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС); и (b) определение степени сходства или различия по меньшей мере одного маркера между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией, при этом по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если по меньшей мере один маркер имеет низкую ковариацию и уровень по меньшей мере одного маркера отличается между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией, или при этом по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если по меньшей мере один маркер имеет высокую ковариацию и уровень по меньшей мере одного маркера одинаков между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией; таким образом идентификацию тестируемой амфолитной композиции с подходящей активностью.

[6] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению этап (a) включает (i) определение точного измерения массы/времени удерживания (AMRT) или поперечного сечения столкновения (CCS) для совокупности компонентов по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции; (ii) построение графика ковариации измерений AMRT или поперечного сечения столкновения для совокупности компонентов по меньшей мере из одной тестируемой и эталонными амфолитными композициями с использованием S-графика; и (iii) выбор по меньшей мере одного компонента, отличающегося между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонными амфолитными композициями, при этом разница включает ковариацию, отличную от 0 на S-графике; таким образом идентификацию по меньшей мере одного маркера для определения характеристик пригодности по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции. В некоторых

вариантах реализации разница включает ковариацию, которая меньше 0 на S-графике. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один компонент содержит ковариацию на S-графике, которая меньше ковариации на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% совокупности компонентов на S-графике. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если уровень по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции отличается.

[7] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению разница в уровне по меньшей мере одного маркера составляет разницу в уровне на по меньшей мере 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% относительно нормализованного уровня по меньшей мере одного маркера.

[8] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению этап (a) включает (i) определение точного измерения массы/времени удерживания (AMRT) или измерения поперечного сечения столкновения для совокупности компонентов по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции; (ii) построение графика ковариации измерений AMRT или поперечного сечения столкновения для совокупности компонентов по меньшей мере из одной тестируемой и эталонной амфолитных композиций с использованием S-графика; и (iii) выбор по меньшей мере одного компонента, сходного между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонными амфолитными композициями, при этом сходство включает ковариацию, отличную от 0 на S-графике; таким образом идентификацию по меньшей мере одного маркера для определения характеристик пригодности по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции. В некоторых вариантах реализации разница включает ковариацию, которая больше 0 на S-графике. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один компонент содержит ковариацию на S-графике, превышающую ковариацию на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% совокупности компонентов на S-графике. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если уровень по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции является сходным.

[9] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению сходство уровня по меньшей мере одного маркера включает уровень, который на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере

90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% является сходным с нормализованным уровнем по меньшей мере одного маркера.

[10] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению по меньшей мере один маркер идентифицируют посредством отношения массы к заряду (m/z). В некоторых вариантах реализации уровень по меньшей мере одного маркера характеризуется относительной интенсивностью m/z в масс-спектре.

[11] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению этап (b) включает: (i) определение масс-спектра ЖХ-МС по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции, (ii) определение относительной интенсивности основного пика по меньшей мере одного маркера в масс-спектрах по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции, (iii) нормирование относительной интенсивности основного пика по меньшей мере одного маркера с максимальной относительной интенсивностью основного пика, измеренной по меньшей мере для одной тестируемой амфолитной композиции или эталонной амфолитной композиции, и (iv) сравнение нормированных относительных интенсивностей основного пика по меньшей мере одного маркера по меньшей мере в одной тестируемой и эталонной амфолитных композициях.

[12] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению по меньшей мере один маркер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 маркеров с разными m/z. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один маркер содержит 16 маркеров с разными m/z. В некоторых вариантах реализации 16 маркеров содержат маркеры с m/z 280, m/z 319, m/z 329, m/z 347, m/z 373, m/z 375, m/z 376, m/z 431, m/z 504, m/z 506, m/z 508, m/z 520, m/z 534, m/z 562, m/z 906 и m/z 980.

[13] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению масс-спектрометрия включает квадрупольную времяпролетную масс-спектрометрию ионной подвижности (IMS-Q-ToF-MS).

[14] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению жидкостная хроматография включает высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ). В некоторых вариантах реализации ВЭЖХ включает колонку с силикагелем С4.

[15] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению способы дополнительно включают валидацию по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции путем создания электрофореграммы эталонного белка с визуализацией капиллярной изоэлектрической фокусировки (iCIEF) с использованием эталонной амфолитной композиции и по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции, тем самым создавая по меньшей мере одну тестовую электрофореграмму и эталонную электрофореграмму.

[16] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению тестируемая амфолитная композиция считается валидированной, если по меньшей мере одна тестовая и эталонная электрофореграммы являются сходными. В некоторых

вариантах реализации сходство по меньшей мере одной тестовой и эталонной электрофореграмм определяется количеством, размером или изоэлектрической точкой (pI) пиков или их комбинацией.

[17] В некоторых вариантах реализации способов по настоящему изобретению подходящая активность включает капиллярное изоэлектрическое фокусирование (CIEF) или капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализацией (iCIEF). В некоторых вариантах реализации iCIEF используют для характеристики белкового лекарственного продукта или лекарственного вещества.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[18] На **фиг. 1A-1B** представлена пара электрофореграмм, анализирующих эталонный белковый продукт с использованием анализа капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (iCIEF). Ось x показывает время (в минутах), а ось y показывает поглощение. На фиг. 1A используется партия амфолита 1. На фиг. 1B показана типичная партия амфолита-кандидата, которая создает другой профиль электрофореграммы для того же эталонного белка, чем партия амфолита, показанная на фиг. 1A. Различия на электрофореграммах обведены кружком.

[19] На **фиг. 2** представлен график, показывающий интерференцию базовой линии на основании градиента амфолита, используемого в iCIEF. ICIEF проводили без эталонного белка. Увеличение концентрации амфолита приводило к уменьшению падения базовой линии. Это изменение профиля пика было обусловлено амфолитами, а не белками или прибором.

[20] На **фиг. 3** представлена электрофореграмма, показывающая, что концентрация фармаколита (амфолита) приводит к изменению площади области. Изменение концентрации фармаколита на 2% вызвало уменьшение площади области 1 на 1%.

[21] На **фиг. 4A-4B** представлены серия электрофореграмм (фиг. 4A) и таблица (фиг. 4B), показывающая изменение разрешения в партиях амфолита. Партии 7 и 2 являются наиболее подходящими кандидатами для статистического анализа партии, наиболее схожей с партией 1.

[22] На **фиг. 5A-5C** представлена серия графиков, показывающих тестирование маркера изоэлектрической точки (PI или pI) партий амфолитов. Разрешение пиков для каждой партии амфолита рассчитывали в диапазоне от 7,0 до 7,05. На фиг. 5A показана типовая электрофореграмма с двумя пиками. На фиг. 5B показано, как рассчитывают разрешение по электрофореграмме. Разрешение рассчитывают на основании времени миграции (цикла) (Rt) и ширины пика (W). На фиг. 5C показана типовая электрофореграмма, на которой пики взаимно перекрываются на 0,15%, или разрешение 1,5, что является хроматографическим минимальным критерием.

[23] На **фиг. 6** представлен график, изображающий проблему, решаемую способами по настоящему изобретению.

[24] На **фиг. 7** представлен график, показывающий рабочий процесс анализа ЖХ-МС амфолита.

[25] На **фиг. 8A** представлена таблица, показывающая партии амфолитов-носителей GE Healthcare IEF, протестированные на их молекулярные компоненты.

[26] На **фиг. 8B** представлен S-график Уотерса (Waters), показывающий тестирование партий амфолита на изменение их молекулярного состава, а не на характеристики. Жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (ЖХ-МС) использовали для идентификации представляющих интерес компонентов в партиях амфолита, которые имеют высокую степень вариации в зависимости от партии. Анализ был выполнен с использованием программного обеспечения UNIFI со встроенными средствами анализа данных и рабочими процессами. S-график показывает различия в соотношении точная масса/время удерживания (AMRT) между партиями амфолитов. Пары AMRT нанесены на график по ковариации, при этом величина изменения показана на оси x, а корреляция, т. е. постоянство изменения, показана на оси y.

[27] На **фиг. 9A-9C** представлены S-графики Уотерса, сравнивающие партии амфолитов, охарактеризованные с использованием квадрупольной времяпролетной масс-спектрометрии ионной подвижности Waters VION IMS QT (LC-IMS-Q-TOF-MS). На фиг. 9A показано сравнение партий 1 и 2. На фиг. 9B показано сравнение партий 1 и 3. На фиг. 9C показано сравнение партий 1 и 5. S-график Уотерса идентифицирует сходства и различия между образцами и обеспечивает мощный инструмент визуальной фильтрации. Для библиотеки амфолитных компонентов были выбраны уникальные признаки, например, были выбраны выделенные точки на S-графике партии 1 по сравнению с партией 5 (фиг. 9C).

[28] На **фиг. 10A** представлена таблица, показывающая библиотеку компонентов амфолита, характеризующихся значением m/z (отношение массы к заряду) и их нормализованными относительными интенсивностями в партиях амфолита с номерами 1 (текущая партия, используемая в стандартной рабочей процедуре, или партия SOP), 2, 3, 4 и 5. Относительные интенсивности были нормализованы по самой высокой относительной интенсивности для всех партий амфолитов. Значения отклика маркера оценивали и сравнивали в формате Excel.

[29] На **фиг. 10B** показаны электрофореграммы iCIEF, анализирующие продукт эталонного белка 1 с использованием 5 различных партий амфолита. Сверху вниз: партия 1 (SOP), партия 3, партия 4 и партия 5. Различия в профилях iCIEF обведены кружком.

[30] На **фиг. 10C** показаны электрофореграммы iCIEF, анализирующие продукт эталонного белка 1 с использованием партии амфолита 1 (вверху, SOP) и партии 2 (внизу). После анализа результатов ЖХ-МС анализировали партию 2, и было прогнозировано, что она будет партией, наиболее схожей с партией 1 (см. фиг. 10A).

[31] На **фиг. 11A** представлен график, показывающий хроматограмму экстрагированных ионов (XIC) с фильтрацией ионной подвижности маркера m/z 906,261 для каждой из указанных партий амфолитов. Отклик XIC используют для сравнения партий.

[32] На **фиг. 11B** представлен график тренда, показывающий маркеры в трех

повторах указанной партии амфолита (ось x указывает партию и повторность) в зависимости от интенсивности маркера (ось y, количества). Маркеры считались релевантными, если они были идентифицированы во всех трех повторах текущей партии и не были обнаружены в контроле.

[33] На **фиг. 12** показаны структуры трех маркеров из библиотеки, использованной для определения характеристик партий амфолитов. Структуры соответствуют маркерам со значениями m/z внизу. Это коммерчески доступные результаты разъяснения.

[34] На **фиг. 13** представлен график, сравнивающий текущий процесс тестирования амфолита с новыми способами тестирования амфолита, описанными в настоящем документе. Текущие способы сокращают время анализа, поскольку анализ новой партии амфолита методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС) занимает 4 часа. Кроме того, новые способы тестирования амфолитов обеспечивают определение характеристик амфолитов без потребления какого-либо белкового продукта. Наконец, новые способы тестирования амфолитов применимы к любому новому поставщику амфолитов. Для каждого поставщика может быть создана новая библиотека маркеров с использованием описанных в настоящем документе способов сравнения партий амфолитов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[35] В настоящем изобретении обеспечены способы идентификации амфолитных композиций с подходящей активностью для требуемых последующих применений, включающие: (a) идентификацию по меньшей мере одного маркера по меньшей мере в одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС); и (b) определение степени сходства или различия по меньшей мере одного маркера между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией. В некоторых вариантах реализации маркеры выбирают на основании различий между эталонной и тестируемой амфолитной композицией, и по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если по меньшей мере один маркер отличается между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией. В некоторых вариантах реализации маркеры выбирают на основании сходства между эталонной и тестируемой амфолитной композицией, и по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если по меньшей мере один маркер является схожим между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией. Маркеры могут быть идентифицированы по определенному отношению массы к заряду (m/z) , измеренному с помощью масс-спектрометрии, а уровни или маркеры могут быть определены по относительной интенсивности указанного пика m/z , который необязательно может быть нормализован. Эта нормализация может относиться к максимальной относительной интенсивности, измеренной для указанного пика m/z в амфолитных композициях в анализе. Маркеры можно дополнительно

охарактеризовать по времени удерживания на этапе разделения жидкостной хроматографией.

[36] Подходящие действия для последующих применений включают, но не ограничиваются ими, гель-электрофорез с изоэлектрической фокусировкой (IEF) и капиллярные эквиваленты, такие как капиллярная изоэлектрическая фокусировка (CIEF) и CIEF с визуализацией (iCIEF).

[37] В некоторых вариантах реализации способы дополнительно включают валидацию по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции путем создания электрофореграммы эталонного белка с визуализацией капиллярной изоэлектрической фокусировки (iCIEF) с использованием эталонной амфолитной композиции и по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции, таким образом создание по меньшей мере одной тестовой электрофореграммы и эталонной электрофореграммы. Сходство тестовой и эталонной электрофореграмм можно определить путем сравнения количества, размера, площади, разрешения и изоэлектрической точки (pI) пиков эталонной и тестовой электрофореграмм или комбинации всех этих характеристик.

Использование амфолитных композиций

[38] В описании обеспечены способы определения пригодности амфолитных композиций для одного или более последующих применений.

[39] Амфолитные композиции, иногда называемые фармалитами (например, коммерчески производимые амфолиты от GE Healthcare), используют в различных способах разделения белков на основании изоэлектрического заряда. Типичные способы, для которых амфолитные композиции могут быть оптимизированы с использованием способов, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, гель-электрофорез с изоэлектрической фокусировкой (IEF) и капиллярные эквиваленты, такие как капиллярное изоэлектрическое фокусирование (CIEF) и CIEF с визуализацией (iCIEF).

[40] Используемый в настоящем документе термин «амфолиты» относится к соединениям, содержащим как положительные, так и отрицательные заряды, которые ведут себя как цвиттерионы при значениях их изоэлектрической точки (pI) и вблизи них. Амфолит может действовать как кислота или основание, в зависимости от pH раствора, в который его вводят. Амфолиты способствуют формированию градиентов pH, например, при фокусировке в iCIEF и CIEF.

[41] Изоэлектрическая точка (pI) представляет собой pH, при котором молекула не несет суммарного электрического заряда. Для белка изоэлектрическая точка представляет собой pH, при котором общий заряд белка равен нулю.

Гель-электрофорез с изоэлектрической фокусировкой (IEF)

[42] IEF представляет собой метод разделения белков на основании заряда, который включает добавление раствора амфолита в гель с иммобилизованным градиентом pH (IPG). IPG содержат матрицу акриламидного геля, сополимеризованную с градиентом pH, который может быть получен путем внедрения амфолитов-носителей в акриламидную матрицу. Полученные градиенты pH стабильны в электрическом поле, за исключением

сильнощелочных (>12) значений pH. Градиент pH для разделения белков полностью устанавливается перед добавлением белковых аналитов путем первоначального воздействия на раствор малых молекул, таких как полиамфолиты, с различными значениями pI, электрофорезом.

[43] При применении электрического поля белок, pH которого находится ниже его изоэлектрической точки (pI), будет заряжен положительно и поэтому будет мигрировать к катоду (отрицательно заряженному электроду). По мере того как он мигрирует через градиент повышающегося pH, общий заряд белка будет уменьшаться до тех пор, пока белок не достигнет области pH, соответствующей его pI. В этот момент у него нет суммарного заряда, и поэтому миграция прекращается (поскольку нет электрического притяжения ни к одному из электродов). В результате белки фокусируются в четкие стационарные полосы, при этом каждый белок располагается в точке градиента pH, соответствующей его pI.

Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (CIEF) и капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализацией (iCIEF)

[44] Капиллярное изоэлектрическое фокусирование (CIEF) и капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализацией (iCIEF) представляют собой аналитические методы, в которых используют отдельные варианты белка, в первую очередь на основании внутреннего суммарного изоэлектрического (pI) заряда белка. В CIEF и iCIEF разделение образцов проводят путем фокусирования образцов белка в амфолитном градиенте pH с помощью примененного электрического поля. Образцы белка предварительно смешивают с амфолитами-носителями, добавками и маркерами pI. Затем образцы белка разделяют в капиллярном картридже с электролитическими резервуарами на каждом конце. Один резервуар заполнен кислотой (анолитом), а другой - щелочью (католитом). Смесь образцов вводят для заполнения капиллярной колонки, а к резервуарам для анолита и католита прикладывают напряжение. Это создает градиент pH, который разделяет и фокусирует белки (аналиты) на основании их pI вдоль капилляра.

[45] В CIEF за этапом фокусировки следует этап мобилизации, на котором сфокусированные аналиты перемещаются по капилляру к выходному отверстию капилляра и мимо детектора, такого как УФ- или флуоресцентный детектор. Способы мобилизации включают гидродинамическую мобилизацию или мобилизацию давлением, *т. е.* путем подачи газа в капилляр, и химическую мобилизацию, при которой анолит или католит заменяют другим раствором электролита с высокой ионной мощностью или другим pH.

[46] В отличие от CIEF, который включает мобилизацию образцов белка через детектор, в iCIEF детектор для всей колонки, такой как УФ- или флуоресцентный детектор, отслеживает весь процесс в капилляре в режиме реального времени. Это позволяет внимательно отслеживать этапом фокусирования, за которым следует настоящий профиль варианта окончательного заряда. Таким образом, преимущества iCIEF по сравнению с другими методами включают высокое разрешение, эффективное время

выполнения и низкое потребление образцов, что делает его предпочтительным методом для определения характеристик белков в биофармацевтической промышленности.

Изменчивость и амфолитные композиции

[47] Результатом анализа белка CIEF или iCIEF может быть электрофореграмма. На электрофореграмме ось x содержит изоэлектрическую точку или время мобилизации. Ось y содержит показания детектора, обычно в единицах поглощения. Пики на электрофореграмме иногда называют пиками поглощения. Изменение амфолитных композиций может привести к изменчивости выходных электрофореграмм.

[48] Электрофореграммы эталонного белка, созданные с использованием тестируемой амфолитной композиции, могут иметь одно или более из следующих изменений по сравнению с электрофореграммой того же эталонного белка, созданной с эталонной амфолитной композицией: (1) усиление одного или более пиков, (2) спад одного или более пиков, (3) сдвиги pI или времени мобилизации нескольких или более пиков, (4) изменение площади под пиком одного или более пиков и (4) изменения разрешения одного или более пиков.

[49] Соответственно, в изобретении обеспечены способы определения того, будет ли тестируемая амфолитная композиция давать электрофореграмму эталонного белка, схожую с электрофореграммой того же эталонного белка, продуцируемого эталонным амфолитом. В некоторых вариантах реализации способы включают (a) идентификацию по меньшей мере одного маркера по меньшей мере в одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС); и (b) определение степени сходства или различия по меньшей мере одного маркера между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией, при этом по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если по меньшей мере один маркер имеет низкую ковариацию и уровень по меньшей мере одного маркера отличается между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией, и при этом по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если по меньшей мере один маркер имеет высокую ковариацию и уровень по меньшей мере одного маркера одинаков между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией; таким образом идентификацию тестируемой амфолитной композиции с подходящей активностью.

[50] В изобретении дополнительно обеспечены способы валидации активности амфолитных композиций, охарактеризованных с использованием способов, описанных в настоящем документе, включающих создание электрофореграмм с использованием эталонной амфолитной композиции и по меньшей мере одной тестируемой композиции и сравнение электрофореграмм для определения их сходства.

[51] В некоторых вариантах реализации сходство по меньшей мере одной тестовой и эталонной электрофореграмм определяется количеством, размером, разрешением,

изоэлектрической точкой (pI) пиков или их комбинацией.

[52] В некоторых вариантах реализации сходные электрофореграммы имеют одинаковое или идентичное количество пиков (например, количество пиков варьируется, составляя 3, 2, 1 или 0 пиков). В качестве дополнительного примера, как тестовая электрофореграмма, так и эталонная электрофореграмма содержат или состоят по существу из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 пиков.

[53] В некоторых вариантах реализации сходство по меньшей мере одной тестовой и эталонной электрофореграмм включает сходное разрешение.

[54] Используемый в настоящем документе термин «разрешение» или «R» представляет собой величину качества разделения, например, разделения пары пиков поглощения на электрофореграмме. Способы расчета разрешения между двумя пиками показаны на фиг. 5A-5C. Разрешение 1,5 (взаимное перекрытие 0,15%) считается базовым разделением двух пиков и критерием хроматографического минимума. Чем больше разрешение, тем лучше разделение двух пиков. Разрешение представляет собой комбинацию двух факторов: селективности и эффективности разделения. Селективность учитывает расстояние между максимумами двух пиков. Более высокая эффективность разделения достигается при более узких пиках. Следовательно, узкие пики и большие расстояния между пиками дают большие значения R. При расчете разрешения используется разница времени миграции или pI двух пиков (Rt_1, Rt_2) и ширины основания пиков (W_1 , W_2).

[55] В некоторых вариантах реализации сходство тестовой и эталонной электрофореграмм включает разницу в разрешении менее 0,30, менее 0,25, менее 0,20, менее 0,175, менее 0,15, менее 0,13, менее 0,12, менее 0,11, менее 0,10, менее 0,08, менее 0,075, менее 0,07, менее 0,05, менее 0,03, менее 0,02 или менее 0,01. В некоторых вариантах реализации сходство тестовой и эталонной электрофореграмм включает разницу в разрешении менее 0,075. В некоторых вариантах реализации сходство тестовой и эталонной электрофореграмм включает разницу в разрешении менее 0,072.

[56] В некоторых вариантах сходство тестовой и эталонной электрофореграмм включает один или более пиков в области электрофореграммы со сходными площадями. В некоторых вариантах реализации разница в площади одного или более пиков в конкретной области тестовой и эталонной электрофореграмм имеет значение вероятности (значение p) меньше или равное 0,05. Способы расчета площади под пиком будут известны специалистам или обычным специалистам в данной области техники и включают, например, подгонку уравнения для кривой к пику и интегрирование для нахождения включенной площади. В некоторых вариантах реализации определенные области эталонной и тестовой электрофореграмм, площади пиков которых рассчитывают, могут быть определены конкретными маркерами pI, включенными в смесь аналитов. В некоторых вариантах реализации определенные области эталонной и тестовой электрофореграмм, площади пиков которых рассчитывают, могут быть определены наличием основного пика, общего для всех электрофореграмм. Например,

электрофореграмму можно разделить на основной пик и области, которые являются кислотными или щелочными по отношению к основному пику.

[57] Значимость можно определить путем расчета значения p, или значения вероятности, которое представляет собой вероятность того, что нулевая модель (например, что два пика случайно будут иметь одинаковую площадь) будет верной. Способы расчета p-значений будут известны специалистам в данной области техники и включают t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрата, дисперсионный анализ (ANOVA), коэффициент корреляции Пирсона и Бонферрони-Данна. В некоторых вариантах реализации считается, что результат является значимым, если значение p меньше 0,05. В некоторых вариантах реализации считается, что результат является значимым, если значение p составляет менее 0,04, менее 0,03, менее 0,02 или менее 0,01.

[58] В некоторых вариантах реализации разница в площади одного или более пиков в конкретной области тестовой и эталонной электрофореграмм имеет коэффициент вариации (% RSD), меньший или равный 5%. Процент RSD определяется как отношение стандартного отклонения к среднему значению и демонстрирует степень изменчивости по отношению к среднему значению заполнения (например, повторяемости электрофореграммы). Способы расчета RSD в процентах известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах реализации набор данных является воспроизводимым, если % RSD меньше 5%. В некоторых вариантах реализации набор данных является воспроизводимым, если % RSD составляет менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1%.

Определение характеристик амфолитных композиций с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС)

[59] В настоящем документе обеспечены способы определения характеристик амфолитных композиций с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС). В некоторых вариантах реализации способы включают идентификацию по меньшей мере одного маркера по меньшей мере в одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС); и определение степени сходства или различия по меньшей мере одного маркера между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией. По меньшей мере один маркер может быть идентифицирован по отношению массы к заряду МС (m/z), рассматриваемому ниже, и уровням по меньшей мере одного маркера, определяемого по относительной интенсивности, измеренной с помощью МС для каждого маркера данного m/z. В некоторых вариантах реализации способы включают идентификацию совокупности маркеров по меньшей мере в одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции с использованием жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС); и определение степени сходства или различия совокупности маркеров между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией.

[60] Жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ЖХ-МС) представляет собой метод аналитической химии, который объединяет возможности физического разделения жидкостной хроматографии (например, высокоэффективной жидкостной хроматографии, или ВЭЖХ) с возможностями масс-анализа масс-спектрометрии (МС). Жидкостная хроматография разделяет смеси с несколькими компонентами, тогда как масс-спектрометрия обеспечивает структурную идентичность и уровни отдельных компонентов с высокой молекулярной специфичностью и чувствительностью обнаружения.

[61] Жидкостная хроматография и масс-спектрометрия описаны в документе EP 3143392, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[62] Используемый в настоящий документ термин «хроматография» относится к процессу, в котором химическая смесь, содержащая жидкость или газ, разделяется на компоненты в результате дифференциального распределения химических соединений, когда они обтекают, протекают над и/или через неподвижную жидкую или твердую фазу. «Жидкостная хроматография» или «ЖХ» относится к процессу селективного замедления одного или более компонентов жидкого раствора, когда жидкость равномерно просачивается через колонку с тонкоизмельченным веществом или через капиллярные каналы. Замедление возникает в результате распределения компонентов смеси между одной или более неподвижными фазами и объемной текучей средой (т.е. подвижной фазой), когда эта текучая среда движется относительно неподвижной фазы (фаз). Жидкостная хроматография включает, но не ограничивается этим, жидкостную хроматографию с обращенной фазой (RPLC), высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), жидкостную хроматографию с высокой турбулентностью (HTLC) и сверхэффективную жидкостную хроматографию. «Время удерживания» относится к продолжительности времени, в течение которого конкретный аналит, такой как компонент амфолитной композиции, удерживается субстратом для жидкостной хроматографии перед элюированием.

[63] Используемый в настоящем документе термин «высокоэффективная жидкостная хроматография» или «ВЭЖХ» относится к жидкостной хроматографии, в которой степень разделения повышается путем пропускания подвижной фазы под давлением через неподвижную фазу, обычно через плотно набитую колонку.

[64] Используемый в настоящем документе термин «сверхэффективная жидкостная хроматография» или «UPLC» относится к способам жидкостной хроматографии с повышенной скоростью, чувствительностью и разрешением по сравнению с ВЭЖХ. Как правило, UPLC применима для частиц диаметром менее 2 мкм. Разделение и количественный анализ в UPLC осуществляют при чрезвычайно высоком давлении (до 100 МПа).

[65] Газовая хроматография (ГХ) относится к методу разделения, в котором используется поток газа через колонку, такую как стеклянная или металлическая колонка, для разделения соединений на основании летучести и взаимодействия с жидкой неподвижной фазой. Подвижная фаза, газ-носитель, обычно представляет собой инертный

газ, такой как гелий, или нереакционноспособный газ, такой как азот.

[66] Масс-спектрометрию выполняют с использованием масс-спектрометра, который содержит источник ионов для ионизации образца и создания заряженных молекул для дальнейшего анализа. В различных вариантах реализации амфолитные композиции и их компоненты могут быть ионизированы любым способом, известным специалисту в данной области техники. Источники ионизации, используемые в различных методах МС, включают, но не ограничиваются ими, электронную ионизацию, химическую ионизацию, ионизацию электрораспылением (ESI), фотонную ионизацию, химическую ионизацию при атмосферном давлении (APCT), фотоионизацию, фотоионизацию при атмосферном давлении (APPI), бомбардировку быстрыми атомами (FAB)/жидкостную вторичную ионизацию (LSIMS), матричную лазерную десорбционную ионизацию (MALDI), полевую ионизацию, полевую десорбцию, ионизацию терморапылением/распылением плазмы, поверхностно усиленную лазерную десорбционную ионизацию (SELDI), индуктивно-связанную плазму (ICP), ионизацию пучком частиц и разделение по ионной мобильности (IMS). Специалисту в данной области техники будет понятно, что выбор способа ионизации может быть определен на основании измеряемого аналита, типа образца, типа детектора, выбора положительного режима в зависимости от отрицательного режима и т. д.

[67] Используемый в данном документе термин «масс-спектрометрия» или «МС» относится к аналитическому методу идентификации соединений по их массе. МС относится к способам фильтрации, обнаружения и измерения ионов на основании отношения их массы к заряду (m/z). Технология МС обычно включает ионизацию соединений с образованием заряженных частиц (например, ионов) и определением точной массы ионов, деленной на их заряд, известным как m/z. Соединения могут быть ионизированы и обнаружены любым подходящим способом. «Масс-спектрометр» обычно включает ионизатор и детектор ионов. Как правило, одну или более представляющих интерес молекул ионизируют, а затем ионы вводят в масс-спектрографический прибор, причем из-за комбинации магнитных и электрических полей ионы следуют по пути в пространстве, который зависит от массы («m») и заряда («z»). См., *например*, патенты США 6,204,500; 6,107,623; 6,268,144; и 6,124,137.

[68] МС может генерировать и обнаруживать как положительные, так и отрицательные ионы. Используемый в настоящем документе термин «ионизация» или «ионизирование» относится к процессу генерирования иона аналита, имеющего суммарный электрический заряд, равный одной или более электронным единицам. Положительные ионы представляют собой ионы, имеющие суммарный положительный заряд одной или более электронных единиц. Отрицательные ионы представляет собой ионы, которые имеют суммарный отрицательный заряд одной или более электронных единиц. В способах «электронной ионизации» или «EI» аналиты в газообразной или паровой фазе взаимодействуют с потоком электронов. Столкновение электронов с аналитом приводит к образованию ионов аналита, которые затем можно подвергнуть

воздействию методов масс-спектрометрии. EI можно сочетать со способами газовой хроматографии (GC) или жидкостной хроматографии. При «химической ионизации» или «CI» газ-реагент (например, аммиак) подвергается столкновению с электронами, и ионы аналита образуются в результате взаимодействия ионов газа-реагента и молекул аналита. При «бомбардировке быстрыми атомами» или «FAB» пучок высокоэнергетических атомов (часто Xe или Ar) воздействует на нелетучий образец, десорбируя и ионизируя молекулы, содержащиеся в образце. Тестируемые образцы растворяют в вязкой жидкой матрице, такой как глицерин, тиоглицерин, м-нитробензиловый спирт, 18-краун-6 краун-эфир, 2-нитрофилиилоктиловый эфир, сульфолан, диэтаноламин и триэтаноламин. Выбор подходящей матрицы для соединения или образца является эмпирическим процессом.

[69] Используемый в настоящем документе термин «ионизация с лазерной десорбцией с помощью матрицы» или «MALDI» относится к способам, в которых нелетучий образец подвергается воздействию лазерного облучения, которое десорбирует и ионизирует аналиты в образце различными путями ионизации, включая фотоионизацию, протонирование, депротонирование и кластерный распад. В случае MALDI образец смешивают с энергопоглощающей матрицей, что облегчает десорбцию молекул аналита. MALDI-TOF относится к масс-спектрометрии (MC) с лазерной десорбцией/ионизацией и времяпролетной матрицей (MALDI-TOF). MALDI-TOF полезна для соединений до около 15 000 дальтон.

[70] «Поверхностно усиленная лазерная десорбционная ионизация» или «SELDI» относится к другому способу, в котором нелетучий образец подвергается воздействию лазерного излучения, которое десорбирует и ионизирует аналиты в образце различными путями ионизации, включая фотоионизацию, протонирование, депротонирование и кластерный распад. В случае SELDI образец обычно прикрепляют к поверхности, которая предпочтительно удерживает один или более представляющих интерес аналитов. Как и в MALDI, в этом процессе можно также использовать энергопоглощающий материал для облегчения ионизации.

[71] «Ионизация электрораспылением» или «ESI» относится к способам, в которых раствор пропускают по короткому отрезку капиллярной трубки, к концу которой прикладывают высокий положительный или отрицательный электрический потенциал. Раствор, достигающий конца трубки, испаряется (распыляется) в виде струи или распыления очень мелких капель раствора в парах растворителя. Этот туман из капель проходит через испарительную камеру, которая слегка нагревается для предотвращения конденсации и испарения растворителя. По мере того, как капли становятся меньше, плотность электрического поверхностного заряда увеличивается до тех пор, пока естественное отталкивание между одноименными зарядами не вызовет высвобождение ионов, а также нейтральных молекул.

[72] «Химическая ионизация при атмосферном давлении» или «APCI» относится к способам масс-спектроскопии, сходным с ESI; однако APCI производит ионы в результате ионно-молекулярных реакций, которые происходят в плазме при атмосферном давлении.

Плазма поддерживается за счет электрического разряда между распыляющим капилляром и противоэлектродом. Затем ионы обычно извлекают в масс-анализатор с использованием набора ступеней скиммера с дифференциальной закачкой. Для улучшения удаления растворителя можно использовать противоток сухого и предварительно нагретого газообразного N_2. Ионизация газовой фазы в APCI может быть более эффективной, чем ESI, для анализа менее полярных частиц.

[73] Используемый в настоящем документе термин «фотоионизация при атмосферном давлении» или «APPI» относится к форме масс-спектроскопии, при которой механизмом фотоионизации молекулы M является поглощение фотона и выброс электрона с образованием молекулярного M+. Поскольку энергия фотона обычно чуть выше потенциала ионизации, молекулярный ион менее подвержен диссоциации.

[74] Используемый в настоящем документе термин «индуктивно-связанная плазма» или «ICP» относится к способам, в которых образец взаимодействует с частично ионизированным газом при достаточно высокой температуре для атомизации и ионизации большинства элементов.

[75] Используемый в настоящем документе термин «спектрометрия ионной подвижности», иногда также называемый «разделением по ионной подвижности» или «IMS», относится к способу аналитической химии, который разделяет ионы в газовой фазе на основании их взаимодействия со сталкивающимся газом и их массами. На первом этапе ионы разделяются в соответствии с их подвижностью через буферный газ в миллисекундном масштабе с использованием спектрометра ионной подвижности. Затем отделенные ионы вводят в масс-анализатор на втором этапе, где их отношение массы к заряду можно определить в микросекундном масштабе.

[76] Используемый в настоящем документе термин «полевая десорбция» относится к способам, в которых нелетучий тестируемый образец помещают на ионизационную поверхность, а интенсивное электрическое поле используют для генерирования ионов аналита.

[77] Используемый в настоящем документе термин «десорбция» относится к удалению аналита с поверхности и/или проникновению аналита в газовую фазу.

[78] После ионизации амфолитной композиции или ее компонентов созданные таким образом ионы можно анализировать для определения m/z. Подходящие анализаторы для определения m/z включают квадрупольные анализаторы, анализаторы с ионной ловушкой, времяпролетные анализаторы, анализаторы ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (FTICR) и спектрометры Orbitrap. Ионы могут быть обнаружены с использованием одного из нескольких режимов обнаружения. Например, только выбранные ионы могут быть обнаружены с использованием режима селективного мониторинга ионов (SIM) или, альтернативно, множество ионов могут быть обнаружены с использованием режима сканирования, например, мониторинга множества реакций (MRM) или мониторинга выбранных реакций (SRM).

[79] В некоторых вариантах реализации m/z определяют с помощью

квадрупольного анализатора (прибора). В приборе «квадруполь» или «квадрупольная ионная ловушка» ионы в осциллирующем радиочастотном поле испытывают силу, пропорциональную потенциалу постоянного тока, прикладываемому между электродами, амплитуде РЧ-сигнала и m/z. Напряжение и амплитуда могут быть выбраны таким образом, чтобы только ионы с определенным значением m/z перемещались по длине квадруполя, а все остальные ионы отклонялись. Таким образом, квадрупольные приборы могут действовать как «масс-фильтр» и как «масс-детектор» для вводимых в прибор ионов. Во времяпролетном методе (ToF) ионы ускоряются в однородном электростатическом поле с помощью заземляющих и отталкивающих электродов. Кинетическая энергия поддерживается постоянной, и ионы движутся по бесполевой трубке ToF. Поскольку кинетическая энергия постоянна (KE=1/2MV^2), ионы с меньшим m/z будут иметь большую скорость по сравнению с большим m/z. «Квадрупольная времяпролетная» или «QTof» масс-спектрометрия относится к типу масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометров, которые соединяют квадруполь, который функционирует как камера столкновений, с времяпролетным анализатором. Это позволяет одновременно проводить анализ всех ионов с высоким разрешением и высокой точностью определения массы. В типовой системе QTof образец доставляется системой жидкостной хроматографии по линии и ионизируется. Затем пучок частиц проходит через ионовод и попадает в квадруполь, а затем попадает в анализатор ToF. В некоторых вариантах реализации метод МС может использовать «тандемную масс-спектрометрию» или «МС/МС». В этом методе ион-предшественник (также называемый исходным ионом), полученный из представляющей интерес молекулы, может быть отфильтрован в приборе MS, и ион-предшественник впоследствии фрагментируется с получением одного или более ионов-фрагментов (также называемых дочерними ионами или ионами-продуктами), которые затем анализируются во второй процедуре МС. При тщательном отборе ионов-предшественников в камеру фрагментации попадают только ионы, образованные определенными аналитами, где при столкновении с атомами инертного газа образуются ионы-фрагменты. Поскольку ионы-предшественники, и ионы-фрагменты образуются воспроизводимым образом при заданном наборе условий ионизации/фрагментации, метод МС/МС может стать чрезвычайно мощным аналитическим инструментом. Например, комбинацию фильтрации/фрагментации можно использовать для устранения мешающих веществ, и она может быть особенно полезна в сложных образцах, таких как биологические образцы.

[80] Масс-спектрометр обычно предоставляет пользователю ионное сканирование или масс-спектр; то есть относительное содержание каждого иона с определенным m/z в данном диапазоне (например, от 400 m/z до 1600 m/z). Масс-спектр может быть связан с количеством аналита, например, компонентом амфолитной композиции, в образце многочисленными способами, известными в данной области техники. Например, учитывая, что параметры отбора образцов и анализа тщательно контролируются, относительное содержание, иногда называемое относительной интенсивностью, данного

иона можно сравнить с таблицей, в которой это относительное содержание преобразовано в абсолютное количество исходной молекулы. Альтернативно, молекулярные стандарты могут быть проанализированы с образцами и может быть построена стандартная кривая на основании ионного сигнала, генерируемого этими стандартами. Способы создания и использования таких стандартных кривых хорошо известны в данной области техники, и специалист в данной области техники может выбрать соответствующий внутренний стандарт. Специалистам в данной области техники хорошо известны многочисленные другие способы связывания количества иона с количеством исходной молекулы.

[81] Когда ионы сталкиваются с детектором, они производят импульс электронов, который преобразуется в цифровой сигнал. Полученные данные передаются на компьютер, который отображает количество ионов в единицу времени. Измеряют площади под пиками, соответствующими конкретным ионам, или амплитуду таких пиков, и площадь или амплитуду коррелируют с количеством представляющего интерес компонента или маркера в амфолитной композиции. В некоторых вариантах реализации измеряют площадь под кривыми или амплитуду пиков иона(ов)-фрагмента(ов) и/или ионов-предшественников для определения количества аналитов с данным значением m/z. Как описано выше, относительное содержание, иногда называемое относительной интенсивностью, или отклик данного иона может быть преобразован в абсолютное количество исходного аналита с использованием калибровочных стандартных кривых, основанных на пиках одного или более ионов внутреннего молекулярного стандарта. Затем абсолютное количество компонента амфолитной композиции, обнаруженное с помощью ЖХ-МС, можно преобразовать в абсолютное количество компонента, который присутствовал в исходном образце.

[82] Относительное содержание или относительную интенсивность также можно определить как ось у масс-спектра. В некоторых вариантах реализации количество маркера можно количественно определить по отношению к количеству наиболее распространенного иона (основной пик) масс-спектра. В некоторых вариантах реализации количество маркера может быть количественно определено с использованием коэффициента отклика или стандартной кривой. В некоторых вариантах реализации количественное определение количества маркера включает в себя (1) включение в образец внутреннего стандарта, например эталонного амфолита и/или тестируемой амфолитной композиции, и (2) нормализацию маркера по внутреннему стандарту в образце. В некоторых вариантах реализации количественное определение количества маркера дополнительно включает (3) нормализацию указанного маркера по максимальному скорректированному количеству маркера, измеренному для нескольких амфолитных композиций. Например, маркер можно нормализовать по максимальному скорректированному отклику (то есть относительной интенсивности) маркера, измеренному для нескольких партий амфолита одного и того же производителя. Внутренние стандарты включают, но не ограничиваются ими, $^{13}C_6$-карбамазепин, который элюируется в середине цикла и обладает высокой эффективностью ионизации.

[83] В некоторых вариантах реализации отклик внутреннего стандарта можно использовать для нормализации значений отклика для каждого m/z для учета дрейфа прибора.

[84] В некоторых вариантах реализации изменение времени удерживания (RT), поперечного сечения столкновения (CCS) или того и другого, а также m/z внутреннего стандарта в ходе цикла можно использовать для установки допусков на параметры назначения маркера.

[85] В некоторых вариантах реализации относительная интенсивность маркера или компонента амфолитной композиции нормализована, например, по максимальной относительной интенсивности этого маркера, измеренной для нескольких амфолитных композиций.

[86] Используемый в настоящем документе термин «точная масса», иногда называемый «измеренной точной массой», представляет собой экспериментально определенную массу с помощью МС, которая позволяет определить элементный состав аналита, такого как компонент амфолитной композиции. «Точная масса/время удерживания» или «AMRT» относится к комбинации (1) времени удерживания компонента амфолитной композиции во время жидкостной хроматографии и (2) точной массы компонента, измеренной с помощью масс-спектрометрии.

[87] Используемый в настоящем документе данные «поперечного сечения столкновения» или CCS могут быть получены с помощью экспериментов по подвижности ионов. Это эффективная площадь взаимодействия между отдельным ионом и молекулой нейтрального газа, которая связана с характеристиками иона, такими как химическая структура и размеры. Его можно получить с помощью таких способов, как измерение подвижности ионов в дрейфовой трубке или IMS с бегущей волной. Например, несколько измерений выполняют в разных электрических полях для расчета значений CCS.

[88] В некоторых вариантах реализации ЖХ-МС включает квадрупольную времяпролетную масс-спектрометрию (UPLC-IMS-Q-Tof_MS) со сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографией и тандемной подвижностью ионов.

[89] Подходящие приборы и системы ЖХ-МС включают, но не ограничиваются ими, систему ЖХ-МС BioAccord для биофармацевтических препаратов (Waters), UPLC Waters Acquity H-класса в комбинации с Waters Vion IMS-Q-ToF-MS, систему ЖХ/МС Agilent Ultivo и систему ЖХ-МС Orbitrap (ThermoFisher).

Определение маркеров для амфолитных композиций

[90] В изобретении обеспечены способы идентификации по меньшей мере одного маркера в амфолитной композиции, включающие: (i) определение точных измерений массы/времени удерживания (AMRT) или измерений поперечного сечения столкновения для совокупности компонентов по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции; (ii) построение графика ковариации измерений AMRT для совокупности компонентов по меньшей мере из одной тестируемой

и эталонной амфолитных композиций с использованием S-графика; и (iii) выбор по меньшей мере одного компонента, который либо отличается между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией, либо выбор по меньшей мере одного компонента, сходного между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией, таким образом идентификацирю по меньшей мере одного маркера для определения характеристик пригодности по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции.

[91] Сходства и различия между измерениями AMRT компонентов амфолитной композиции можно определить любым статистическим способом, известным в данной области техники. Один из подходов включает расчет и построение графика ковариации пар AMRT между компонентами по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной композиции. Ковариация, используемая в настоящем документе, относится к совместной изменчивости двух случайных переменных. Если большие значения одной переменной в основном соответствуют большим значениям другой переменной, и то же самое верно для меньших значений (т. е. переменные имеют тенденцию демонстрировать сходное поведение), ковариация является положительной. В противоположном случае, когда большие значения одной переменной в основном соответствуют меньшим значениям другой (т. е. переменные имеют тенденцию демонстрировать противоположное поведение), ковариация является отрицательной.

[92] Ковариация может быть рассчитана с использованием таких способов, как анализ основных компонентов (PCA), ортогональная проекция на ланетнные структуры - дискриминационный анализ (OPLS-DA) и S-график Уотерса, которые будут известны специалистам в данной области техники.

[93] «Анализ основных компонентов» или «PCA» представляет собой статистическую процедуру, в которой используют ортогональное преобразование для преобразования набора вероятно коррелированных переменных в набор значений линейно некоррелированных переменных, называемых основными компонентами. Это преобразование определяют таким образом, что первый основной компонент имеет наибольшую возможную дисперсию (то есть учитывает как можно большую изменчивость данных), а каждый последующий компонент, в свою очередь, имеет максимально возможную дисперсию при ограничении, которое ортогонально предыдущим компонентам. Таким образом, PCA обеспечивает сокращение больших наборов многомерных данных в некоррелированные переменные, известные как основные компоненты. PCA ограничен тем, что на основании графика нельзя получить информацию об отдельных группах образцов.

[94] В некоторых вариантах реализации данные могут быть дополнительно извлечены с использованием ортогональной проекции на латентные структуры - дискриминационного анализа (OPLS-DA). Этот статистический анализ обеспечивает идентификацию специфических признаков (например, видов амфолитов), которые

содействуют общим различиям, наблюдаемым между двумя группами.

[95] В некоторых вариантах реализации данные PCA и, необязательно, OPLS-DA можно рассматривать как S-график. S-график представляет собой статистический способ отображения различий между двумя группами значений. Таким образом, S-график сравнивает два образца (например, при измерениях n=3, минимум). Например, пары AMRT и/или измерения CCS компонентов из эталонной и тестовой амфолитных композиций могут быть нанесены на график с использованием S-графиков. На S-графике ковариацию, или величину изменения, наносят по оси x, а корреляцию, т. е. постоянство изменения, наносят по оси y. Чем дальше от начала оси x расположен маркер, тем больший его вклад в дисперсию между группами, а маркеры, расположенные дальше по оси y, представляют более высокую достоверность аналитического результата. На типовом S-графике нанесена ковариация пар AMRT по меньшей мере из одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции. Каждая точка на S-графике представляет собой конкретное m/z с соответствующим значением RT и CCS. Маркеры нанесены на график по согласованности между повторами в зависимости от величины изменения. Чем дальше от начала оси x, тем больше различие в интенсивности (или относительной концентрации) между образцами. Различия между группами могут быть связаны с маркерами, которые присутствуют только в одной группе, или с маркерами, интенсивность которых сильно различается между группами. Чем дальше от начала оси Y, тем надежнее аналитические результаты при трехкратном измерении. S-график можно использовать для идентификации того, какие признаки наиболее различаются между партиями, и эти маркеры можно использовать для создания библиотеки скрининга для определения характеристик партий амфолитов.

[96] В некоторых вариантах реализации способы идентификации по меньшей мере одного маркера для определения пригодности амфолитной композиции включают: (i) определение точных измерений массы/времени удерживания (AMRT) для совокупности компонентов по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции; (ii) построение графика ковариации измерений AMRT для совокупности компонентов по меньшей мере из одной тестируемой и эталонной амфолитных композиций с использованием S-графика; и (iii) выбор по меньшей мере одного компонента, имеющего различие между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонными амфолитными композициями, при этом различие представляет собой ковариацию меньше 0 на S-графике; таким образом идентификацию по меньшей мере одного маркера для определения характеристик пригодности по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции. Когда ковариация меньше 0 на S-графике, парные значения AMRT имеют отрицательную корреляцию между эталонной и тестируемой амфолитными композициями. Соответственно, по меньшей мере один маркер выбирают на основании различий между эталонной и тестируемой амфолитными композициями, а различия в присутствии и/или уровне по меньшей мере одного маркера между эталонной и тестируемой амфолитными композициями определяют

пригодность тестируемой амфолитной композиции.

[97] В некоторых вариантах реализации, например в тех вариантах реализации, в которых по меньшей мере один маркер представляет собой маркер различий между эталонной и тестируемой амфолитной композицией, причем по меньшей мере один компонент, выбранный в качестве маркера, имеет ковариацию на S-графике, меньшую, чем ковариация на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% совокупности компонентов на S-графике.

[98] В некоторых вариантах реализации различие в уровне по меньшей мере одного маркера включает различие в уровне по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% относительно нормализованного уровня по меньшей мере одного маркера. Например, эталонная амфолитная композиция включает нормализованный уровень по меньшей мере одного маркера, составляющий 100%, а тестируемая амфолитная композиция включает нормализованный уровень по меньшей мере одного маркера, составляющий 30%. Маркеры можно охарактеризовать по отношению массы к заряду (m/z), а уровни маркеров определяют по относительной интенсивности, нормализованной по максимальной относительной интенсивности, как описано в настоящем документе.

[99] В некоторых вариантах реализации способы идентификации по меньшей мере одного маркера для определения пригодности амфолитной композиции включают (i) определение точных измерений массы/времени удерживания (AMRT) для совокупности компонентов по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции; (ii) построение графика ковариации измерений AMRT для совокупности компонентов по меньшей мере из одной тестируемой амфолитной композиции и эталонных амфолитных композиций с использованием S-графика; и (iii) выбор по меньшей мере одного компонента, сходного между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонными амфолитными композициями, при этом сходство включает ковариацию больше 0 на S-графике; таким образом идентификацию по меньшей мере одного маркера для определения характеристик пригодности по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции. Когда ковариация больше 0 на S-графике, парные значения AMRT положительно коррелируют между эталонной и тестируемой амфолитными композициями. Соответственно, по меньшей мере один маркер выбирают на основании сходств между эталонной и тестируемой амфолитными композициями, а сходство в присутствии и/или уровне по меньшей мере одного маркера между эталонной и тестируемой амфолитными композициями определяет пригодность тестируемой амфолитной композиции.

[100] В некоторых вариантах реализации, например в тех вариантах реализации, в которых по меньшей мере один маркер представляет собой маркер сходства между эталонной и тестируемой амфолитными композициями, по меньшей мере один

компонент, выбранный в качестве маркера, имеет ковариацию на S-графике, превышающую ковариацию на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% от совокупности компонентов на S-графике.

[101] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если уровень по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции является сходным. В некоторых вариантах реализации сходство уровня по меньшей мере одного маркера включает уровень, который на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% является сходным с нормализованным уровнем по меньшей мере одного маркера. Например, эталонная амфолитная композиция содержит нормализованный уровень по меньшей мере одного маркера, который составляет 100%, а тестируемая амфолитная композиция содержит нормализованный уровень по меньшей мере одного маркера, который составляет по меньшей мере 90%. В качестве дополнительного примера, эталонная амфолитная композиция имеет нормализованный уровень по меньшей мере одного маркера, который составляет 100%, а тестируемая амфолитная композиция имеет нормализованный уровень по меньшей мере одного маркера, который составляет по меньшей мере 80%. Маркеры можно охарактеризовать по отношению массы к заряду (m/z), а уровни маркеров определяют по относительной интенсивности, нормализованной по максимальной относительной интенсивности, как описано в настоящем документе.

[102] В изобретении обеспечены способы определения степени сходства или различия по меньшей мере одного маркера между по меньшей мере одной тестируемой и эталонной амфолитной композицией. В некоторых вариантах реализации способы включают: (i) определение масс-спектра ЖХ-МС по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции, (ii) определение относительной интенсивности основного пика для по меньшей мере одного маркера в масс-спектрах по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции, (iv) нормализацию относительной интенсивности основного пика по меньшей мере одного маркера по максимальной относительной интенсивности основного пика, измеренной на основании по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции или эталонной амфолитной композиции и (iv) сравнение относительных интенсивностей нормализованных относительных интенсивностей основного пика по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой и эталонной амфолитных композициях.

[103] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один маркер содержит совокупность маркеров. В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один маркер содержит по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или 100 маркеров с

разными m/z.

[104] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один маркер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 маркеров с разными m/z.

[105] В некоторых вариантах реализации по меньшей мере один маркер содержит 16 маркеров с разными m/z. В некоторых вариантах реализации 16 маркеров содержат маркеры с m/z 280, m/z 319, m/z 329, m/z 347, m/z 373, m/z 375, m/z 376, m/z 431, m/z 504, m/z 506, m/z 508, m/z 520, m/z 534, m/z 562, m/z 906 и m/z 980.

[106] Подходящие совокупности маркеров с разными m/z, которые можно использовать для определения характеристик тестируемых амфолитных композиций, можно определить de novo относительно эталонной амфолитной композиции с использованием способов, описанных в настоящем документе. Например, путем определения характеристик эталонной и тестируемой амфолитных композиций с помощью ЖХ-МС, построения графика пар AMRT с помощью S-графика и выбора по меньшей мере одного или совокупности маркеров на основании ковариации.

[107] В качестве альтернативы или в дополнение тестируемые амфолитные композиции могут быть охарактеризованы с использованием способов, описанных в настоящем документе, посредством сравнения с предварительно определенной библиотекой маркеров, которые ранее были определены с использованием способа, описанного в настоящем документе. Например, относительные интенсивности по меньшей мере одного или совокупности маркеров тестируемой амфолитной композиции могут быть определены с помощью ЖХ-МС и сравнены с поредварительно определенной эталонной или стандартной библиотекой маркеров.

[108] В настоящем описании приведено многочисленные типовые конфигурации, способы, параметры и т. п. Однако следует понимать, что такое описание не несет ограничительного характера в отношении объема настоящего изобретения, а вместо этого приводится в качестве описания типовых вариантов реализации.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: протокол капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (iCIEF) для определения уровней вариантов заряда белка и/или идентичности белковых продуктов

[109] iCIEF используют для лабораторных тестов лекарственных веществ, составленных лекарственных веществ, лекарственных препаратов и материалов, находящихся в процессе производства, для которых установлены письменные спецификации. При использовании для тестирования выпуска в соответствии со спецификациями необходимо соблюдать стандартные операционные процедуры (SOP) для iCIEF и устранять любые отклонения. Далее следует типовой протокол iCIEF SOP, на результат которого влияет изменение в зависимости от партии амфолита, используемой в протоколе SOP.

[110] Определения

iCIEF - капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализацией.

pI - изоэлектрическая точка, pH молекулы, причем суммарный заряд равен нулю.

Область 1 (кислая) - группа пиков, которые являются относительно кислыми по сравнению с самым большим пиком электрофореграммы iCIEF.

Область 2 (нейтральная) - основной пик/пики, соответствующие наибольшему белковому пику/пикам.

Область 3 (щелочная) - группа пиков, которые являются относительно основными по сравнению с самым большим пиком электрофореграммы iCIEF.

Амфолиты - соединения, имеющие как положительные, так и отрицательные заряды, которые ведут себя как цвиттер-ионы при своих значениях pI и близко к ним. Амфолиты способствуют формированию градиента pH во время фокусирования.

Измерение времени переноса - эксперимент, проводимый для обеспечения надлежащего ввода образца. Измерение выполняют при запуске прибора iCE3 или установке нового картриджа.

Режим предварительного смешивания - образцы белков предварительно смешиваютя с фармалитами-носителями, добавками и маркерами pI.

[111] Материалы

Трубки Safe-Lock Eppendorf, 1,5 мл (VWR, кат. № 21008-959) или аналогичная трубка из тех же конструкционных материалов

Картридж cIEF с покрытием FC (ProteinSimple, PN 101701)

Янтарные пробирки объемом 10 мл, 22×75, с крышками (тонкие перегородки) (ProteinSimple, PN 045-139)

Полипропиленовая пробирка с формованной вставкой 300 мкл (ProteinSimple, PN 045-133)

Упаковка с перегородами iCE3 (крышки 300 мкл) (ProteinSimple, PN 045-134)

Электролитическая пипетка (ProteinSimple, PN 101788) или аналогичная пипетка из тех же конструкционных материалов

Переносной капилляр микроинъектора, с покрытием (ProteinSimple, PN 102694)

Микропробирка объемом 5 мл, натуральная (Argos Technologies, кат. № T2076) или аналогичная пробирка из тех же конструкционных материалов

Центробежный фильтр Amicon Ultra-0,5 с мембраной Ultracel-10 (Millipore, кат. № UFC501096)

[112] Химические вещества

Вода, очищенная с помощью системы Milli-Q или приобретенная, например, вода класса ВЭЖХ (VWR, кат. № JT4218-3) или вода для инъекций (WFI), (APP Pharmaceuticals, кат. № 918510)

Соответствующий эталонный стандарт антител (текущая стандартная партия)

Мочевина (Sigma-Aldrich, BioXtra, кат. № U0631)

3-10 фармалитов (VWR кат. № 17-0456-01 или Sigma кат. № P1522-25ML), хранить при температуре 2-8 °C.

0,5% раствор метилцеллюлозы (MC) (ProteinSimple, PN 102505)

1% раствор метилцеллюлозы (MC) (ProteinSimple, PN 101876)

Набор электролитов (ProteinSimple, PN 102506):

100 мл 0,08 M H3PO4

100 мл 0,1 M NaOH

Маркер pI pI 5,12 (ProteinSimple, PN 102224)

Маркер pI pI 9,50 (ProteinSimple, PN 101996)

[113] Оборудование

Микроцентрифуга для подготовки к тесту

Анализатор вариантов заряда ProteinSimple iCE3

Одноканальные пипетки VWR (VWR №№ 89130-554, 556, 560, 562, 566) или пипетки с аналогичными диапазонами

Стерильные наконечники пипеток (VWR) или наконечники, соответствующие используемым пипеткам

Пипетки прямого вытеснения (Rainin №№ MR-10, MR-100, MR-250, MR-1000)

Наконечники пипеток прямого вытеснения Rainin (Rainin №№ C-10, C-100, C-250, C-1000)

Пипетка Eppendorf Repeater Plus (VWR, кат. № 21516-002)

Наконечники пипеток Eppendorf Combitips (VWR, кат. № 21516-138)

Аналитический баланс

[114] Реагентные растворы

[115] Объемы растворов реагентов можно регулировать по мере необходимости.

[116] 8M раствор мочевины: чтобы получить 8M раствор мочевины, взвешивают 2,4 г мочевины в конической пробирке объемом 5 мл. Медленно добавляют воду примерно до отметки 4 мл. Смесь перемешивают, пока мочевина не растворится. Доведят раствор водой до конечного объема 5 мл. Хорошо смешивают. Свежие образцы готовят ежедневно.

[117] Основная смесь: ниже приведен один препарат, который следует масштабировать по мере необходимости. Для общего способа iCIEF в качестве кислотных и щелочных маркеров рекомендуются маркеры pI 5,12 и pI 9,50. Основную смесь следует хорошо перемешивать и ежедневно получать свежую порцию.

Таблица 1. Основная смесь

Компонент	**Количество**
8M раствор мочевины	50 мкл
3-10 фармалитов	8 мкл
1% раствор метилцеллюлозы (MC)	70 мкл
Вода	30 мкл
pI-маркер (кислотный)	1 мкл
Маркер pI (основание)	1 мкл

[118] Процедура

[119] Для запуска iCE3 можно использовать стандартную процедуру запуска.

[120] Получение эталонного стандарта: любой текущий эталонный стандарт может быть использован для демонстрации пригодности системы. Соответствующий эталонный образец разбавляют водой до концентрации 2 мг/мл. Стандарты смешивают путем осторожного переворачивания, и пробирки вращают приблизительно 15 секунд в микроцентрифуге.

[121] В отдельной пробирке смешивают 40 мкл эталонного стандарта или тестового препарата изделия с концентрацией 2 мг/мл со 160 мкл основной смеси. Для инъекций требуемой пригодности системы необходимо подготовить по меньшей мере 2 пробирки. Эта подготовка может быть соответствующим образом масштабирована. Аккуратно перемешивают и вращают приблизительно 15 секунд, чтобы содержимое опустилось на дно пробирки.

[122] Получение образца в процессе: образец разбавляют в процессе до концентрации 2 мг/мл с помощью воды. Смешивают путем осторожного переворачивания. Собирают устройство центробежной фильтрации, поместив фильтр в чистую микроцентрифужную пробирку. Предварительно смачивают мембрану фильтра пипеткой 400 мкл воды в фильтр, убедившись, что вся мембрана покрыта. Удаляют воду из фильтра с помощью пипетки и утилизируют воду в контейнере для отходов. Загружают 200 мкл разбавленного образца с концентрацией 2 мг/мл в предварительно смоченный фильтр. Закрывают устройство центробежной фильтрации, закрыв крышкой пробирку микроцентрифуги в прикрепленном фильтре. Центрифугируют устройство при относительной центробежной силе 14 000 (rcf) в течение 15 минут.

[123] Снимают устройство с центрифуги. Снимают фильтр с устройства и переворачивают его в чистую микроцентрифужную пробирку. Удаляют микроцентрифужную пробирку, содержащую удаленный буфер. После помещения фильтра в чистую микроцентрифужную пробирку его нельзя будет закрыть крышкой. Помещают не закрытое крышкой устройство с перевернутым фильтром в центрифугу и вращают в течение 2 минут при 1000 об/мин. После центрифугирования концентрированный белок будет находиться в микроцентрифужной пробирке. Удаляют фильтр.

[124] Восстанавливают концентрированный белок в 180 мкл воды. Аккуратно перемешивают и вращают приблизительно 15 секунд, чтобы содержимое опустилось на дно пробирки.

[125] Смешивают 40 мкл отфильтрованного образца со 160 мкл основной смеси. Осторожно перемешивают и вращают приблизительно 15 секунд, чтобы содержимое опустилось на дно пробирки.

[126] Получение лекарственного вещества, составленного лекарственного вещества и/или лекарственного препарата: если концентрация образца составляет менее 20 мг/мл, следует придерживаться процедуры замены буфера, описанной выше для образца в процессе производства, вместо приведенного ниже протокола для получения

лекарственного вещества, составленного лекарственного вещества или лекарственного препарата.

[127] Если лекарственное вещество, составленное лекарственное вещество или лекарственный препарат представляют собой антитело, его нельзя встряхивать на любом этапе получения.

[128] Разбавляют тестируемое изделие (лекарственное вещество, составленное лекарственное вещества или лекарственный препарат) водой до концентрации 2 мг/мл. Смешивают путем осторожного переворачивания и вращают пробирки приблизительно 15 секунд в микроцентрифуге. В отдельной пробирке смешивают 40 мкл препарата тестируемого изделия с концентрацией 2 мг/мл и 160 мкл основной смеси. Осторожно перемешивают и вращают приблизительно 15 секунд, чтобы содержимое опустилось на дно пробирки.

[129] Получение контроля: смешивают 40 мкл воды с 160 мкл основной смеси. Осторожно перемешивают и вращают приблизительно 15 секунд, чтобы содержимое опустилось на дно пробирки.

[130] Загрузка образца с использованием инструментария iCE3: используют режим предварительного смешивания iCE3. Переносят 150 мкл супернатанта образцов (получение эталонного стандарта/эталонного раствора, тестируемого образца и контроля), полученных, как описано выше, в полипропиленовой пробирке с формованной вставкой объемом 300 мкл. Убеждаются в том, что на дне пробирок нет пузырьков воздуха.

[131] Помещают пробирки с образцами в автосэмплер Alcott 720. Заполняют янтарную пробирку объемом 10 мл приблизительно 8 мл 0,5% метилцеллюлозы (МЦ) и помещают в положение «D» в автосэмплере. Ежедневно используют свежий раствор МС, чтобы предотвратить рост микробов. Вставляют водопроводную трубку в свежую емкость с водой Milli-Q и помещают над прибором. Помещают трубку для отходов в специальный контейнер для отходов.

[132] Установка и запуск порции (iCE3): открывают программное обеспечение CFR. Нажимают «Порция/данные» и выбирают «Разработка». Появится окно «Управление файлами порций». Создают файл порции, используя один из следующих вариантов:

(1) чтобы создать новый файл порции, вводят имя файла порции и выбирают папку для сохранения порции. Выбирают количество циклов ввода и нажимают «Новый файл».

(2) чтобы запустить новый файл порции, используя ранее сохраненный файл порции в качестве шаблона, находят требуемый файл в левой панели окна «Управление файлами порций». Нажимают «Открыть файл». Нажимают кнопку «Сохранить как», вводят новое имя файла и нажимают «ОК».

[133] В порции начальный ввод должен быть контролем. Тестируемые образцы должны быть заключены в квадратные скобки по меньшей мере пятью вводами соответствующего эталонного стандарта продукта. Рекомендуются три ввода эталонного стандарта перед вводом тестируемого образца и два после этого, всего пять вводов эталонного стандарта.

[134] Иногда могут возникать пропущенные вводы или случайные пики, которые мешают профилю белка, что приводит к нетипичным электрофореграммам (с точки зрения интенсивности, количества и характера пиков). Повторные вводы контроля, эталонного стандарта и тестируемого изделия могут быть сделаны в течение 24 часов после первоначального ввода с использованием по меньшей мере пяти вводов эталонного стандарта в качестве квадратных скобок, при условии, что используемый эталонный стандарт подходит для ввода соответствующих образцов.

[135] Устанавливают параметры периода фокусирования для обработки порции: вводят уникальное описательное имя файла для каждого ввода. В качестве идентификатора образца вводят обозначение эталонного стандарта/эталонного раствора, номер LIMS или другой идентификатор образца. Пробирки последовательно нумеруют. Для периода фокусирования 1 (предварительное фокусирование) используются следующие параметры: 1 минута при 1500 В. Для периода фокусирования 2 (фокусирование) используются следующие настройки: 7 минут при 3000 В. Продолжительность промывки составляет 90 секунд, а время задержки передачи равно 0,00 минут.

[136] Устанавливают параметры автосемплера:

Контроль температуры: Да; установить на 10 °C.

Продолжительность ввода буфера: значение по умолчанию.

Продолжительность ввода образца: значение по умолчанию.

Продолжительность загрузки: 6 секунд.

Тип пробирки: 2 мл со вставкой на 300 мкл.

Глубина ввода иглы: 48 мм.

Продолжительность ввода пробы и буфера определяется во время измерения времени передачи (проверка системы на запуск/установку картриджа) и основана на продолжительности времени, в течение которого появляется плато. Рекомендуется продолжительность по меньшей мере на 10 секунд больше, чем продолжительность плато.

[137] Вводят следующую информацию в разделе «Условия образца»:

Амфолиты-носители: 4% 3-10 фармалитов

Добавки: 2 М мочевині, 0,35% МС

Маркер низкого pI: значение pI кислотного маркера в основной смеси (5,12).

Маркер высокого pI: значение pI щелочного маркера в основной смеси (9,50)

Концентрация [мкг/мкл]: 0,40

Выбирают тип образца (необязательно)

Следует обратить внимание, что для концентрации концентрация контроля равна 0. Окончательные концентрации образцов в процессе могут варьироваться в зависимости от используемого коэффициента разбавления.

[138] Преобразование данных

[139] Преобразование данных можно выполнить с помощью программного обеспечения CFR iCE. Программное обеспечение CFR можно использовать для создания

электрофореграмм и установки маркеров pI для электрофореграмм контроля, эталонного стандарта и тестируемого образца. Программное обеспечение CFR также можно использовать для преобразования данных в другие форматы, такие как Empower, для дополнительного анализа.

[140] Пригодность фильтра

[141] На электрофореграммах вводов контроля, эталонного стандарта и тестируемого образца должны присутствовать как кислые (низкие), так и щелочные (высокие) маркеры pI. Повторные ввода эталонного стандарта должны быть сходными по профилю (т. е. по интенсивности, количеству и характеру пиков). Каждая из области 1 и области 2 по меньшей мере пяти повторных вводов эталонного стандарта должны иметь средний результат % площади, который соответствует спецификации продукта с %RSD $\leq$ 5%.

[142] Проверка достоверности анализа

[143] Профиль тестируемого изделия должен быть качественно сходным с типовой электрофореграммой из рабочего руководства по применению конкретного продукта в отношении интенсивности, количества и характера пиков. Не должно быть никаких пиков в представляющей интерес области белка ввода контроля, как указано в соответствующем рабочем руководстве по применению конкретного продукта.

[144] Анализ вариантов заряда белка

[145] Результаты выведены с точностью до одного десятичного знака. Для эталонного стандарта сообщается средний % повторяемости областей 1, 2 и 3 для всех вводов. Также сообщается % RSD между всеми повторными вводами областей 1, 2 и 3 и среднее значение pI области 2 только для информации. Для тестового изделия (иногда называемого тестовым образцом) сообщаются данные, указанные в соответствующей спецификации продукта или протоколе. Если нет доступного протокола, сообщается % площади областей 1, 2 и 3. Среднее значение pI в области 2 сообщается только для информации.

Пример 2: изменение партии амфолита вызывает дисперсию электрофореграммы

[146] Амфолиты представляют собой критически важный реагент для анализов iCIEF. Однако разные партии амфолитов дают разные электрофореграммы даже при анализе одного и того же эталонного белка, что приводит к сбою при тестировании контроля качества (ср. фиг. 1A и 1B).

[147] Эталонный белок 1 анализировали с использованием iCIEF, как описано выше для примера 1, с использованием партии амфолита 1 (текущий стандарт) и различных партий тестируемых амфолитов. В приведенной ниже таблице 1 представлены партии амфолитов GE, протестированные в ходе данного анализа.

Таблица 1. 3-10 лотов с pH фармалитов GE Healthcare

Проанализированные партии GE
1 (текущий стандарт)

2
3
4
5

[148] Электрофореграммы iCIEF эталонного белка 1, созданные в идентичных условиях, но с разными партиями амфолита, продемонстрировали существенные различия в профилях (например, ср. фиг. 1A с фиг. 1B, ср. электрофореграммы на фиг. 4A или 10B).

[149] Изменение концентрации фармаколита в анализе iCIEF показало, что изменение концентрации амфолита всего на 2% может вызвать изменения на электрофореграммах. Например, изменение концентрации амфолита с 4% до 6% привело к уменьшению на 1% площади области 1 для эталонного белка 1 (фиг. 3).

[150] Различия в партии амфолита также влияли на разрешение пиков на электрофореграммах iCIEF. Как показано на фиг. 5A-5C, разрешение каждого амфолита рассчитывали для pI в диапазоне от 7,0 до 7,05. Как показано на фиг. 4A-4B, различные партии амфолита демонстрируют различное разрешение пиков в диапазоне от 7,0 до 7,05.

Пример 3: определение характеристик партии амфолита с помощью ЖХ-МС и создание библиотеки маркеров

[151] Традиционно партии амфолитов оценивают косвенно, оценивая характеристики анализа iCIEF. Авторы изобретения разработали способы непосредственного определения характеристик партии амфолита. Эти способы анализируют сами амфолиты с помощью ЖХ-МС, а не анализируют способность партий амфолитов создавать электрофореграммы известного эталонного белка. Данный способ характеризует химический состав самих амфолитов с помощью UPLC IMS-Q-ToF-MS и сопоставляет его с характеристиками анализа iCIEF с использованием известного эталонного белка.

[152] Амфолит GE партии 1 использовали для установления критериев в стандартных операционных процедурах (SOP). Однако требуется замена партии. В разных партиях амфолитов GE наблюдались различия между партиями, и эти различия приводили к разным электрофореграммам во время повторных анализов одного и того же образца, что приводило к неудачным тестам контроля качества. Это можно увидеть в примере 2.

[153] Таким образом, был разработан способ определения характеристик амфолита с использованием UPLC IMS-Q-ToF-MS для оценки партий-кандидатов. Цель состоит в том, чтобы химически характеризовать партии амфолитов и отслеживать компоненты, которые различаются между ними. Это предлагает способы определения характеристик амфолита для будущих партий-кандидатов GE и служит рабочим процессом, который можно применять к другим поставщикам. Даже без состава амфолита, предоставленного поставщиком, данный способ обеспечивает сравнение партии-кандидата с текущей партией с помощью многовариантного статистического анализа для оценки различий.

[154] Еще одним преимуществом использования указанных способов является то,

что эталонный стандарт белка не расходуется, а экономия образца составляет 70:1 или уменьшается количество расходуемого образца.

[155] Схема способов тестирования амфолита показана на фиг. 7. Вкратце, партии амфолитов анализируют трижды в чистом виде. Партии амфолитов разделяют с использованием квадрупольной времяпролетной масс-спектрометрии ионной подвижности Waters VION IMS QTof (LC-IMS-Q-TOF-MS) с колонкой C4 и полным сканированием, которая идентифицирует компоненты партии амфолита с отношением массы к заряду (m/z) в диапазоне от 50 до 2000, хотя этот диапазон может варьироваться. Компоненты были определены в пределах допусков спектрометрии ионной подвижности (IMS), m/z и времени удерживания (RT). Различия в компонентах, идентифицированные с помощью ЖХ-МС, анализировали с помощью многовариантного анализа и наносили на график с использованием S-графиков Уотерса. Многовариантный анализ идендифицировал различия между партиями амфолитов, которые использовались для создания библиотеки компонентов, которую можно использовать для оценки различий между партиями с прогнозированием того, какие партии будут вести себя аналогично стандартной партии амфолита в анализе iCIEF с эталонным белком.

[156] На фиг. 8A показаны партии амфолитов, которые были проанализированы методом ЖХ-МС для создания библиотеки компонентов.

[157] На фиг. 8B показан типовой S-график Уотерса для данных ЖХ-МС амфолита. S-график Уотерса показывает различия между двумя партиями амфолитов в соотношении точная масса/время удерживания (AMRT). Пары AMRT наносят на график по ковариации. Величина изменения показана на оси x, а корреляция или постоянство изменения показана на оси y. То есть чем дальше по оси x расположен компонент маркера, тем больше вклад этого маркера в дисперсию между партиями амфолита и тем больше различие концентраций этого маркера между партиями. Чем дальше по оси y расположен компонент маркера, тем выше согласованность результата между повторами. Различия между амфолитами могут быть связаны с компонентами, присутствующими или отсутствующими в одной или более партиях амфолитов, и/или изменениями концентрации выбранных маркеров между партиями.

[158] Процедура UPLC IMS-Q-ToF-MS:

[159] Разделение проводили в системе Waters Acquity UPLC H-класса с дегазатором, охладителем, четырехканальным насосом и автосэмплером. Аналитическая колонка Waters BEHTM C4 2,1×100 мм с размером частиц 1,7 мкм работала при скорости потока 0,2 мл/мин. Для ввода образца использовали аликвоту 10 мкл. Подвижная фаза состояла из 0,1% муравьиной кислоты в воде (A) и 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (B). Градиент начинался с 95% A и 5% B, поддерживаемых в течение 5 минут, после чего следовал линейный рост до 95% B через 35 минут. Это состояние поддерживалось в течение 5 минут перед переключением обратно на 95% A через 50 минут. Колонку выдерживали в этих условиях еще 10 минут для повторного уравновешивания колонки; общее время цикла составляло 60 минут.

[160] Waters Vion IMS-Q-ToF-MS использовали при положительной ионизации электрораспылением (+ESI) в режиме точного масс-скрининга в режиме данных MSe. Масс-спектрометр имел следующие параметры: капиллярное напряжение (2,00 кВ), температура источника (150 ºC), температура десольватации (200 ºC), конический газ (25 л/ч) и газ десольватации (800 л/ч). Сбор и анализ данных проводили с помощью программного обеспечения UNIFI™ версии 1.9.4.0.

[161] Были оценены пять партий амфолитов (-1, -2, -3, -4 и -5), и в 500 мкл каждой партии было добавлено 25 мкл 1 мкг мл-1 $^{13}C_6$-карбамазепина, который был выбран в качестве внутреннего стандарта из-за его элюирования в середине цикла и высокой эффективности ионизации. Отклик внутреннего стандарта использовали для нормализации значений отклика для каждого маркера m/z с учетом дрейфа прибора. Кроме того, изменение времени удерживания (RT), перекрестного сечения столкновений (CCS) и m/z внутреннего стандарта в ходе цикла использовали для установки допусков на уровне параметров для назначения маркера. Каждый образец амфолита вводили в чистом виде (n=3) из одной и той же пробирки. Между каждой партией также анализировали контроли составов исходной подвижной фазы.

[162] Обработка данных начиналась с фильтрации и статистического анализа. Анализ основных компонентов (PCA) обеспечивает уменьшение больших наборов многовариантных данных до некоррелированных переменных, известных как основные компоненты. PCA ограничен тем, что на основании графика нельзя получить информацию об отдельных группах образцов, но данные можно дополнительно извлечь с использованием ортогональной проекции на латентные структуры - дискриминационного анализа (OPLS-DA). Указанный статистический анализ обеспечивает определение специфических признаков (например, видов амфолитов), которые вносят вклад в общие различия, наблюдаемые между двумя группами, и его можно рассматривать как S-график. На S-графике сравниваются два образца (измерения n=3, минимум); каждая точка на S-графике представляет собой конкретное m/z с соответствующим значением RT и CCS. Маркеры нанесены на график по согласованности между повторами в зависимости от величины изменения. Чем дальше от начала оси x, тем больше различие в интенсивности (или относительной концентрации) между образцами. Различия между группами могут быть связаны с маркерами, которые присутствуют только в одной группе, или с маркерами, интенсивность которых сильно различается между группами. Чем дальше от начала оси Y, тем надежнее аналитические результаты при трехкратном измерении. S-график использовали для определения того, какие характеристики наиболее различаются между партиями, и эти маркеры были добавлены в библиотеку скрининга. Выбранные маркеры должны были присутствовать во всех 3 измерениях образца амфолита и не должны были присутствовать в контролях. Затем эту библиотеку использовали для оценки присутствия или отсутствия конкретных маркеров для каждой партии, а также присутствия при конкретной интенсивности. Маркеры, которые, как предполагалось, оказывают большее влияние на характеристики анализа, были дополнительно

исследованы путем выяснения структуры и выполнения поиска в базе данных для идентификации.

[163] Результаты:

[164] На фиг. 10B-10C показано изменение профилей iCIEF, созданных с использованием партий 1, 3, 4 и 5. Тестирование с помощью iCIEF показало, что партия 5 продемонстрировала самые разные результаты по сравнению с партией 1 (фиг. 10B-10C). На фиг. 10B электрофореграммы становятся все более непохожими на партию 1, начиная с партии 1. Электрофореграмма, полученная с использованием партии 2 (фиг. 10C), была наиболее сходна с той, что была создана с помощью партии 1. На основании библиотеки маркеров, показанной на фиг. 10A, прогнозировали, что партия 2 будет иметь наибольшее сходство по компонентам амфолита с партией 1, текущей стандартной партией амфолита. Как видно на фиг. 10C, когда партию 2 использовали для создания профиля iCIEF эталонного белка 1, этот профиль имел большее сходство с профилем эталонного белка 1 партии 1, чем любой из профилей iCIEF, созданных с помощью партий 3, 4 или 5 (фиг. 10B). Таким образом, библиотеку компонентов амфолита можно использовать для непосредственной идентификации партий амфолита, которые создают профили iCIEF, сходные со стандартной партией, партией 1.

[165] На фиг. 9A-9C показаны S-графики Уотерса, сравнивающие три разные партии амфолита с текущей стандартной партией, партией 1. S-график 1 по сравнению с 5 показал, что в партии 1 было много признаков, которые отсутствуют или имеют меньшую интенсивность в партии 5 (фиг. 9C). Маркеры, которые отличались больше всего, были добавлены в библиотеку (см. фиг. 10A), используемую для определения характеристик других партий амфолитов. S-график 1 по сравнению с 2 на фиг. 9A показывает соответствие между двумя партиями. Этот вывод был подтвержден результатами iCIEF, которые показали, что, из всех протестированных партий GE, 2 дала результат, наиболее сходный с 1. Из этого S-графика не были выбраны маркеры.

[166] Точки в рамках на фиг. 10C указывают на компоненты, которые были выбраны для библиотеки компонентов, используемых для определения характеристик партий амфолитов. Маркеры, которые были идентифицированы на основании S-графика, оценивали вручную, чтобы убедиться, что они присутствуют во всех трех измерениях партии, в которой они были обнаружены, и что они уникальны для амфолитов и не присутствуют в контроле (фиг. 11B).

[167] Кроме того, хроматограмму экстрагированных ионов (XIC) контролировали, чтобы убедиться, что наблюдался гауссов пик (фиг. 11A). Все маркеры, соответствующие критериям, были добавлены в библиотеку скрининга. Затем эту библиотеку использовали для оценки того, какие маркеры присутствуют, в каких партиях и с какой интенсивностью. Была создана тепловая карта представляющих интерес маркеров, в которой нормализованный отклик внутреннего стандарта в каждой партии был разделен на максимальный нормализованный отклик по 5 партиям и умножен на 100 с получением процента (фиг. 10A). Тренд, наблюдаемый на тепловой карте, был подтвержден

результатами тестирования iCIEF. Чем больше обнаруженная разница между маркерами в партии 1 по сравнению с другими партиями, тем больше электрофореграмма отклонялась от SOP. Маркеры, которые, как предполагалось, оказывают большее влияние на эффективность анализа, были дополнительно исследованы путем выяснения структуры и выполнения поиска в базе данных для идентификации (фиг. 12) с использованием научной информационной системы UNIFI на основании расчета элементного состава, поиска в базе структурных данных и сопоставления фрагментов данных о высокой энергии столкновения (см. фиг. 12 в отношении структур, фиг. 11A в отношении примера хроматограммы, используемой для идентификации).

[168] Выводы:

[169] Определение характеристик изменений амфолита в зависимости от партии с помощью UPLC IMS-Q-ToF-MS позволило успешно прогнозировать эффективность партии во время тестирования iCIEF. Данный способ повысит эффективность выбора новых партий амфолитов, уменьшит количество тестов iCIEF и сэкономит эталонный стандартный белок. Этот же рабочий процесс может действовать для многих материалов и поставщиков, если в будущем будут наблюдаться различия между партиями.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации тестируемой амфолитной композиции с подходящей активностью, включающий:

идентификацию по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и в эталонной амфолитной композиции с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ЖХ-МС); и

определение степени сходства или различия по меньшей мере одного маркера между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией,

при этом по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если по меньшей мере один маркер имеет низкую ковариацию и уровень по меньшей мере одного маркера отличается между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией,

или при этом по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если по меньшей мере один маркер имеет высокую ковариацию и уровень по меньшей мере одного маркера является сходным между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией;

таким образом идентификацию тестируемой амфолитной композиции с подходящей активностью.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап (а) включает:

определение точных измерений массы/времени удерживания (AMRT) и/или поперечного сечения столкновения для совокупности компонентов по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции;

построение графика ковариации измерений AMRT и/или поперечного сечения столкновения для совокупности компонентов из по меньшей мере одной тестируемой и эталонной амфолитных композиций с помощью S-графика; и

выбор по меньшей мере одного компонента, отличающегося между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией, при этом различие включает ковариацию, отличную от 0 на S-графике;

таким образом идентификацию по меньшей мере одного маркера для определения характеристик пригодности по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что по меньшей мере один компонент содержит ковариацию на S-графике, которая меньше ковариации на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70% или по меньшей мере 80% совокупности компонентов на S-графике.

4. Способ по п. 2 или 3, отличающийся тем, что по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если уровень по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и

эталонной амфолитной композиции отличается.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что различие в уровне по меньшей мере одного маркера включает различие в уровне на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% относительно нормализованного уровня по меньшей мере одного маркера.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап (a) включает:

определение измерений точной массы/времени удерживания (AMRT) или поперечного сечения столкновения для совокупности компонентов по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции;

построение графика ковариации измерений AMRT или поперечного сечения столкновения для совокупности компонентов из по меньшей мере одной тестируемой и эталонной композиций амфолита с помощью S-графика; и

выбор по меньшей мере одного компонента, сходного между по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композицией и эталонной амфолитной композицией, при этом сходство включает ковариацию, отличную от 0 на S-графике;

таким образом идентификацию по меньшей мере одного маркера для определения характеристик пригодности по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что по меньшей мере один компонент включает ковариацию на S-графике, превышающую ковариацию на по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% от совокупности компонентов на S-графике.

8. Способ по п. 6 или 7, отличающийся тем, что по меньшей мере одна тестируемая амфолитная композиция обладает подходящей активностью, если уровень по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции является сходным.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что сходство уровня по меньшей мере одного маркера включает уровень, который на по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% является сходным с нормализованным уровнем по меньшей мере одного маркера.

10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что по меньшей мере один маркер идентифицируют по отношению массы к заряду (m/z).

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что уровень по меньшей мере одного маркера характеризуется относительной интенсивностью m/z в масс-спектре.

12. Способ по п. 11, отличающийся тем, что этап (b) включает:

определение масс-спектра ЖХ-МС по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции,

определение относительной интенсивности основного пика для по меньшей мере одного маркера в масс-спектрах по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции и эталонной амфолитной композиции,

нормализацию относительной интенсивности основного пика по меньшей мере одного маркера по максимальной относительной интенсивности основного пика, измеренной на основании по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции или эталонной амфолитной композиции, и

сравнение нормализованных относительных интенсивностей основного пика по меньшей мере одного маркера в по меньшей мере одной тестируемой и эталонной амфолитных композициях.

13. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что по меньшей мере один маркер содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 маркеров с разными m/z.

14. Способ по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что по меньшей мере один маркер содержит 16 маркеров с разными m/z.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что 16 маркеров содержат маркеры с m/z 280, m/z 319, m/z 329, m/z 347, m/z 373, m /z 375, m/z 376, m/z 431, m/z 504, m/z 506, m/z 508, m/z 520, m/ z 534, m/z 562, m/z 906 и m/z 980.

16. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что масс-спектрометрия включает квадрупольную времяпролетную масс-спектрометрию ионной подвижности (IMS-Q-ToF-MS).

17. Способ по любому из пп. 1-16, отличающийся тем, что жидкостная хроматография включает высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что ВЭЖХ включает колонку с силикагелем С4.

19. Способ по любому из пп. 1-18, дополнительно включающий валидацию по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции путем создания электрофореграммы эталонного белка капиллярного изоэлектрического фокусирования с визуализацией (iCIEF) с помощью эталонной амфолитной композиции и по меньшей мере одной тестируемой амфолитной композиции, таким образом создание по меньшей мере одной тестовой электрофореграммы и эталонной электрофореграммы.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что тестируемая амфолитная композиция валидируется, если по меньшей мере одна тестовая и эталонная электрофореграммы являются сходными.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что сходство по меньшей мере одной тестовой и эталонной электрофореграмм определяют по количеству, размеру или изоэлектрической точке (pI) пиков или их комбинации.

22. Способ по п. 20 или 21, отличающийся тем, что сходство по меньшей мере одной тестовой и эталонной электрофореграмм включает наличие идентичного количества пиков.

23. Способ по любому из пп. 20-22, отличающийся тем, что сходство по меньшей

мере одной тестовой и эталонной электрофореграмм включает различие в площади под пиком области эталонной и по меньшей мере одной тестовой электрофореграмм со значением p менее 0,05.

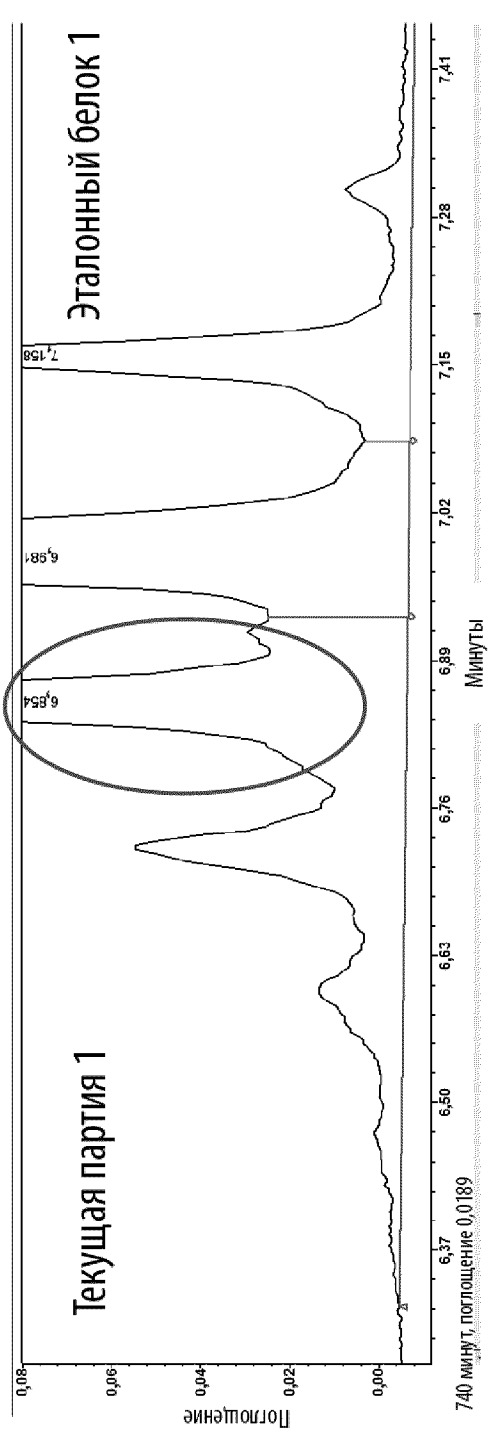
24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что область включает основной эталонный пик, область, которая является более кислой, чем основной эталонный пик, или область, которая является более щелочной, чем основной эталонный пик.

25. Способ по любому из пп. 1-24, отличающийся тем, что подходящая активность включает капиллярное изоэлектрическое фокусирование (CIEF) или капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализацией i(CIEF).

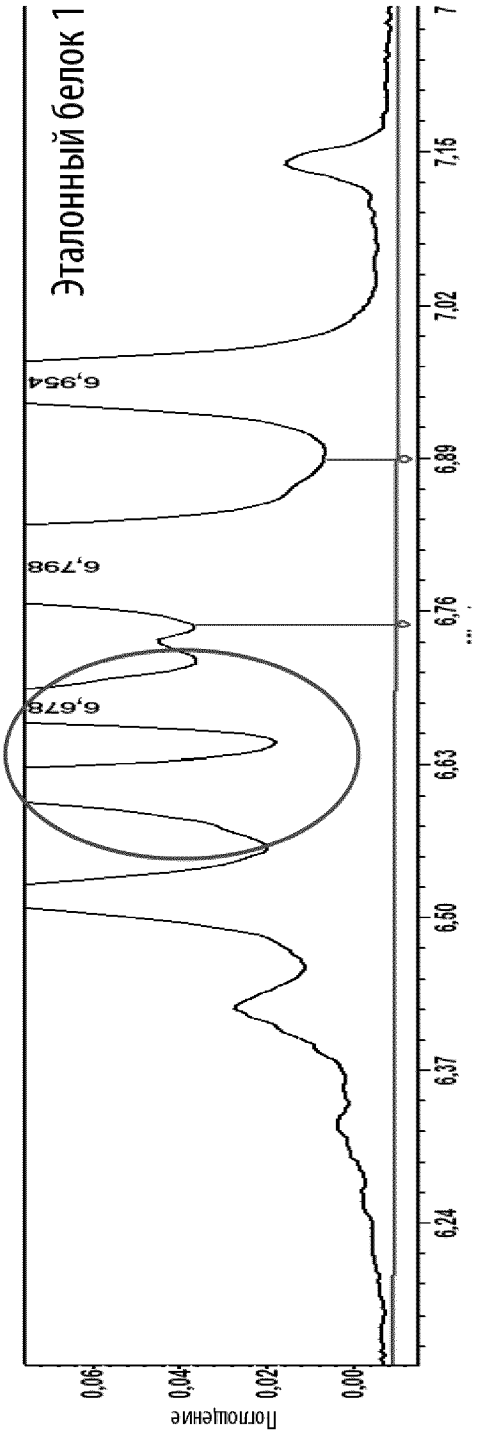
26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что iCIEF применяют для определения характеристик белкового лекарственного продукта или лекарственного вещества.

По доверенности

Фиг. 1А


Текущая партия 1
Эталонный белок 1
6,854
6,981
7,158
Поглощение
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
6,37
6,50
6,63
6,76
6,89
7,02
7,15
7,28
7,41
Минуты
740 минут, поглощение 0,0189

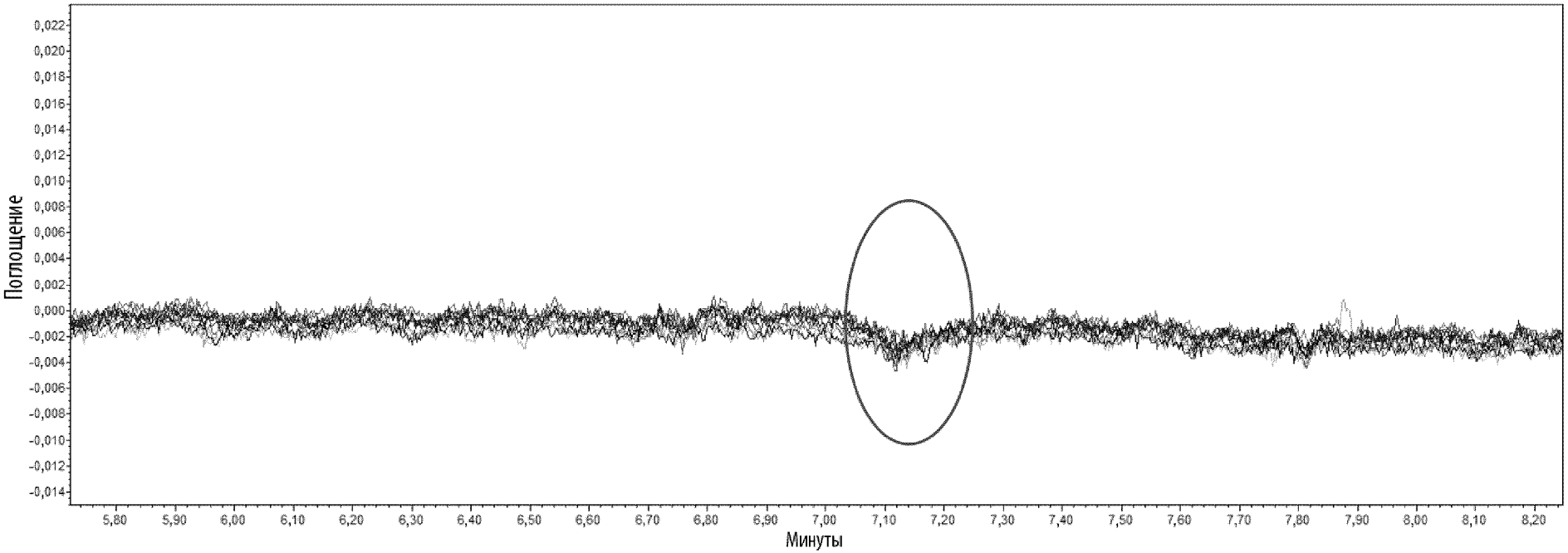
Фиг. 1В


Эталонный белок 1
6,678
6,798
6,954
Поглощение
0,06
0,04
0,02
0,00
6,24
6,37
6,50
6,63
6,76
6,89
7,02
7,15

ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

Фиг. 2

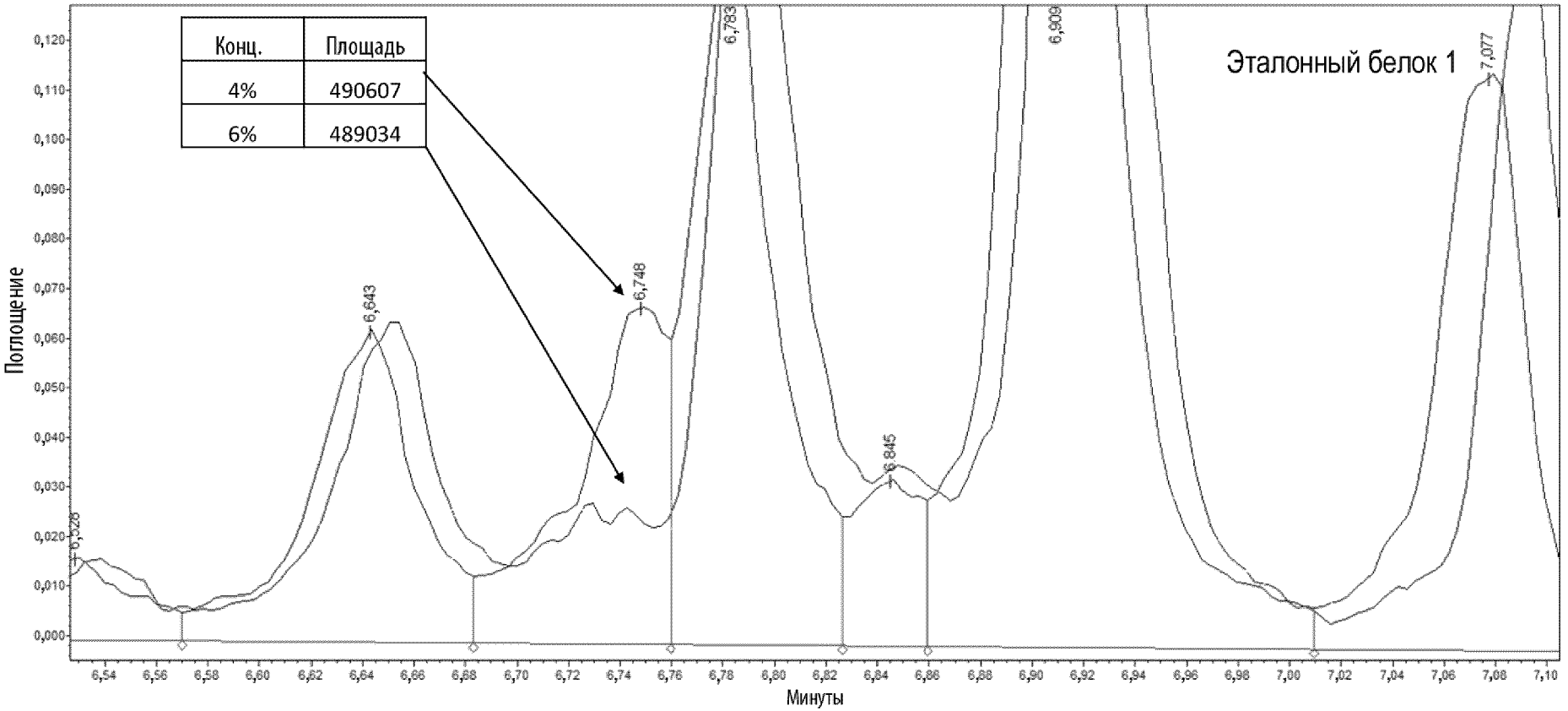
Увеличение концентрации амфолита привело к снижению исходного падения



Изменение профиля пика из-за амфолитов, а не из-за белков или инструмента

ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

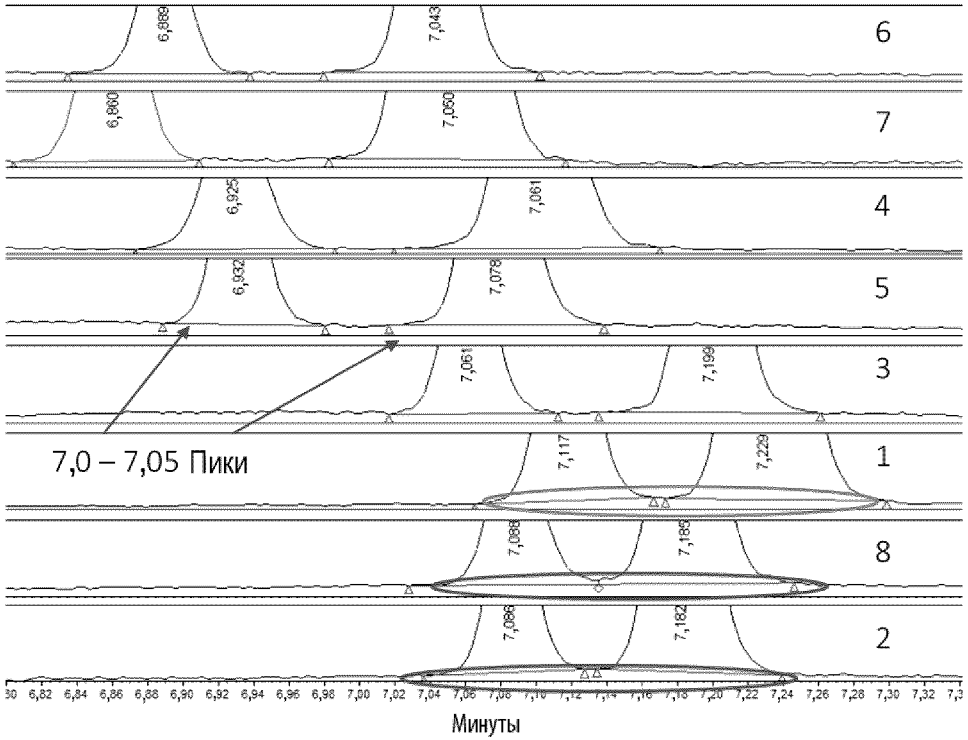
Фиг. 3



Изменение концентрации фармалита на 2% вызвало уменьшение площади на 1% в области 1

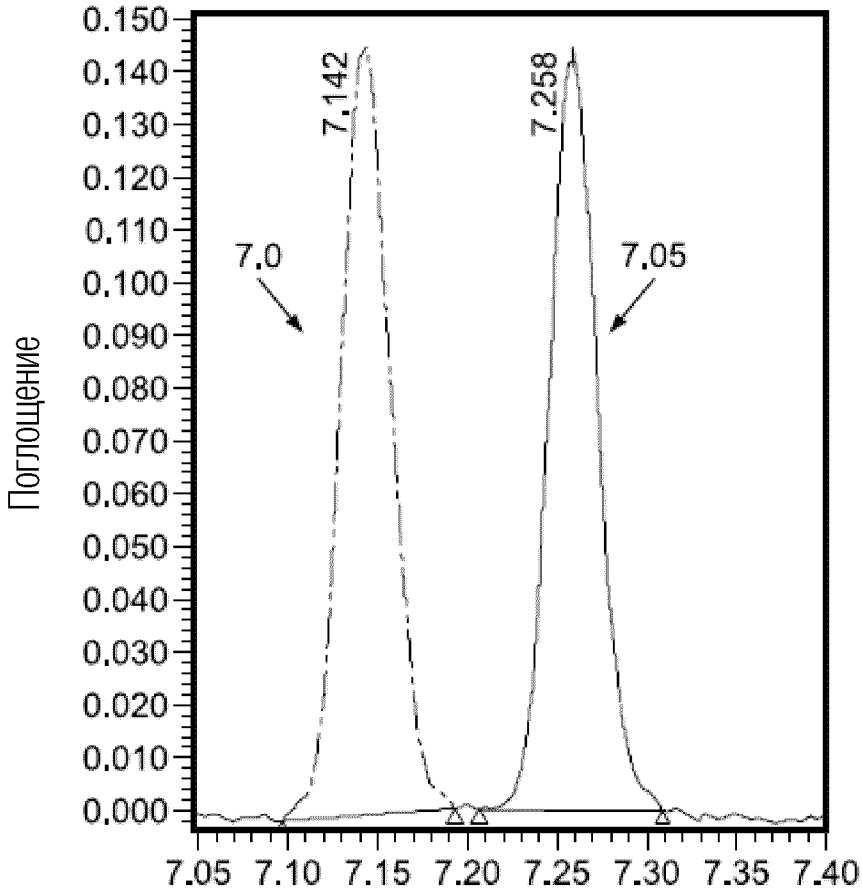
ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

Фиг. 4A

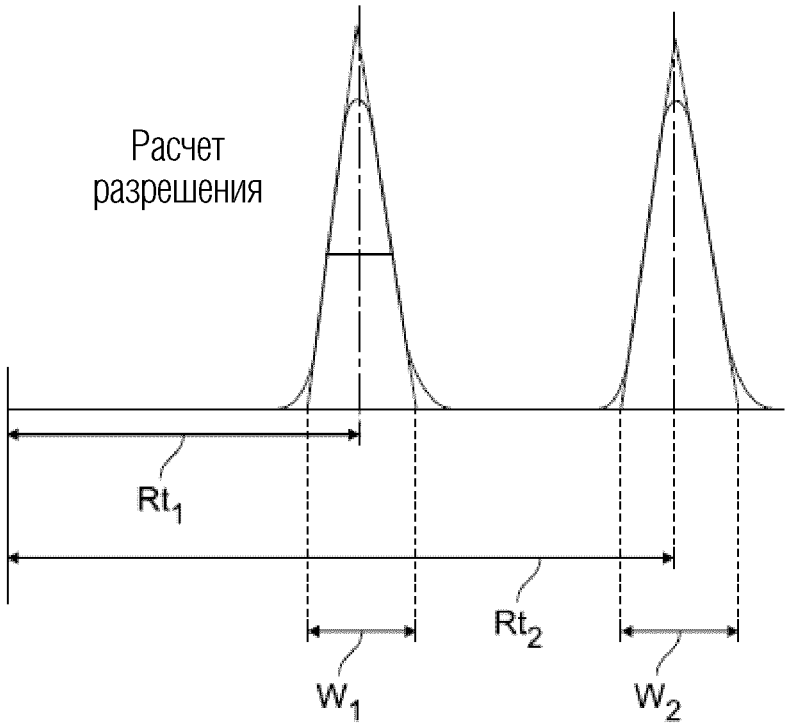


Фиг. 4B

Партия амфолита	Разрешение
6	2,808
7	2,729
4	2,530
5	2,651
3	2,069
1	***1,894***
8	***1,802***
2	1,731

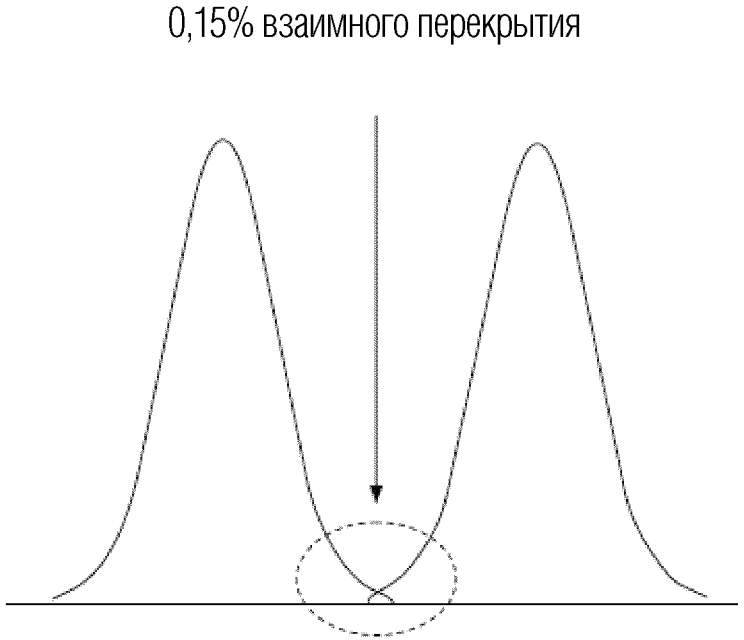

Поглощение
0.150
0.140
0.130
0.120
0.110
0.100
0.090
0.080
0.070
0.060
0.050
0.040
0.030
0.020
0.010
0.000
7.142
7.258
7.0
7.05
7.05
7.10
7.15
7.20
7.25
7.30
7.35
7.40

ФИГ. 5А



$$R = 2.0\,(Rt_2 - Rt_1)/(W_2 + W_1)$$

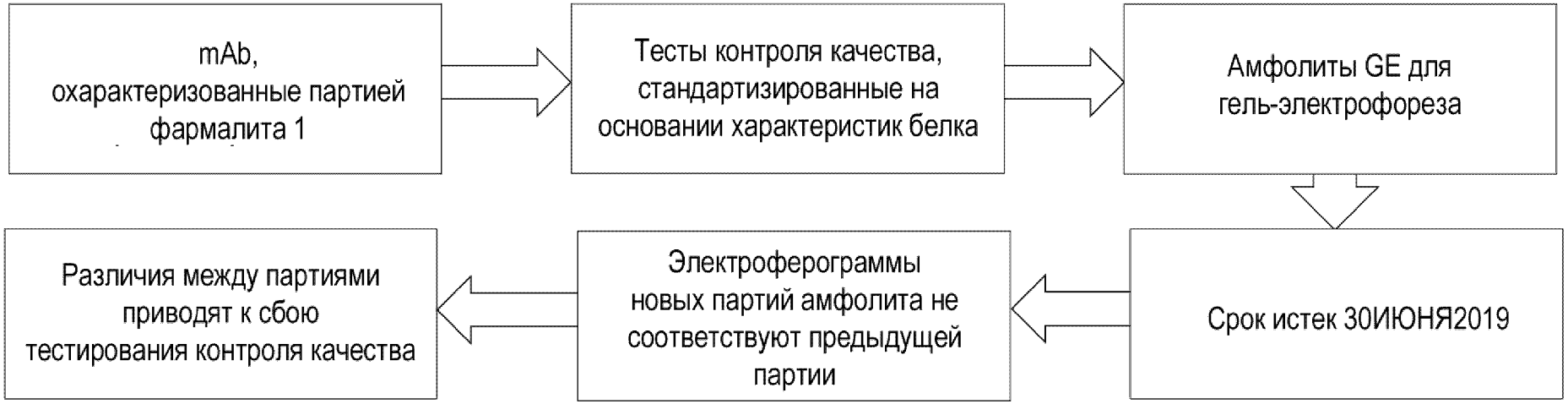
ФИГ. 5B



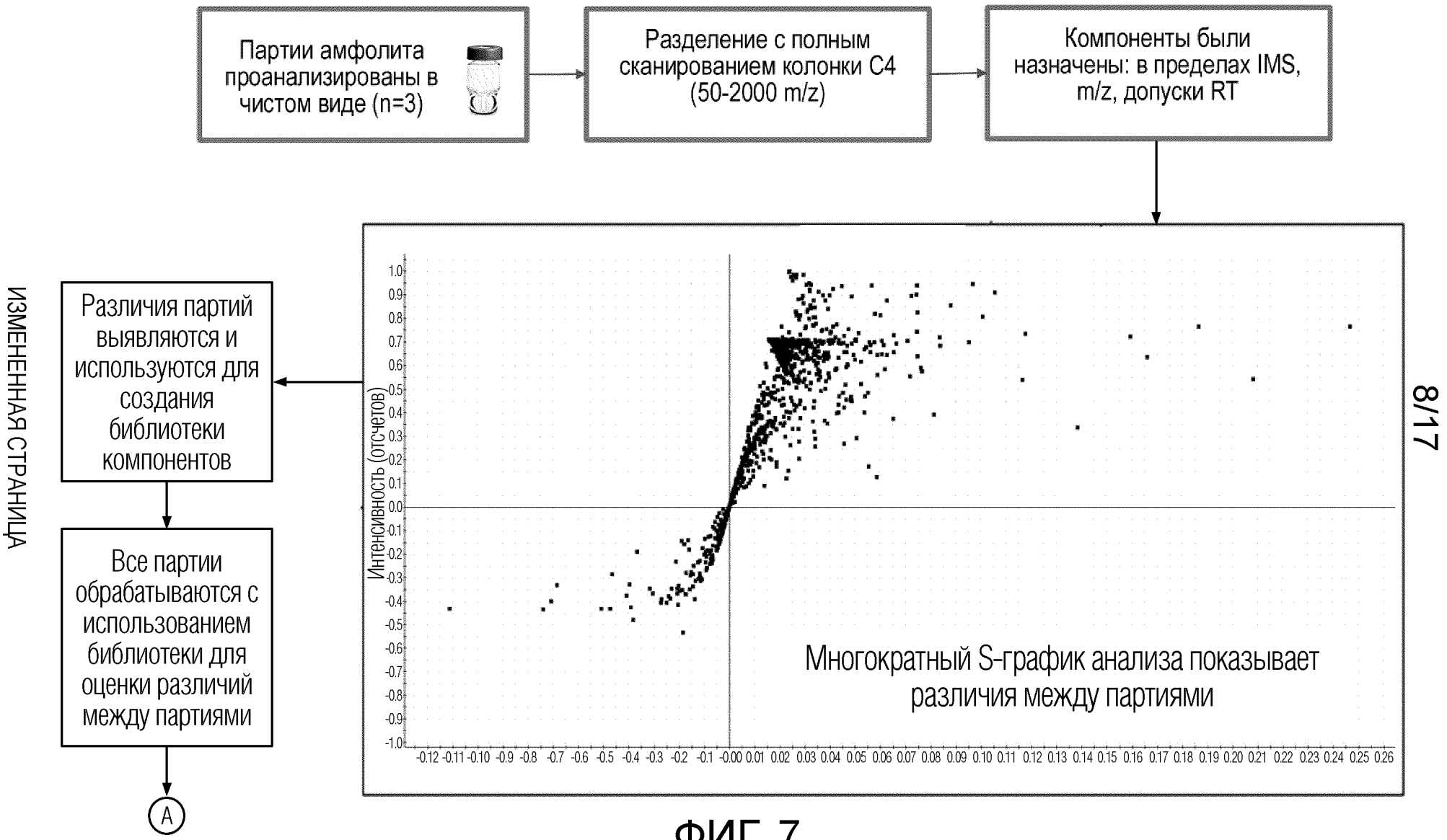
Хроматографические минимальные критерии

ФИГ. 5C

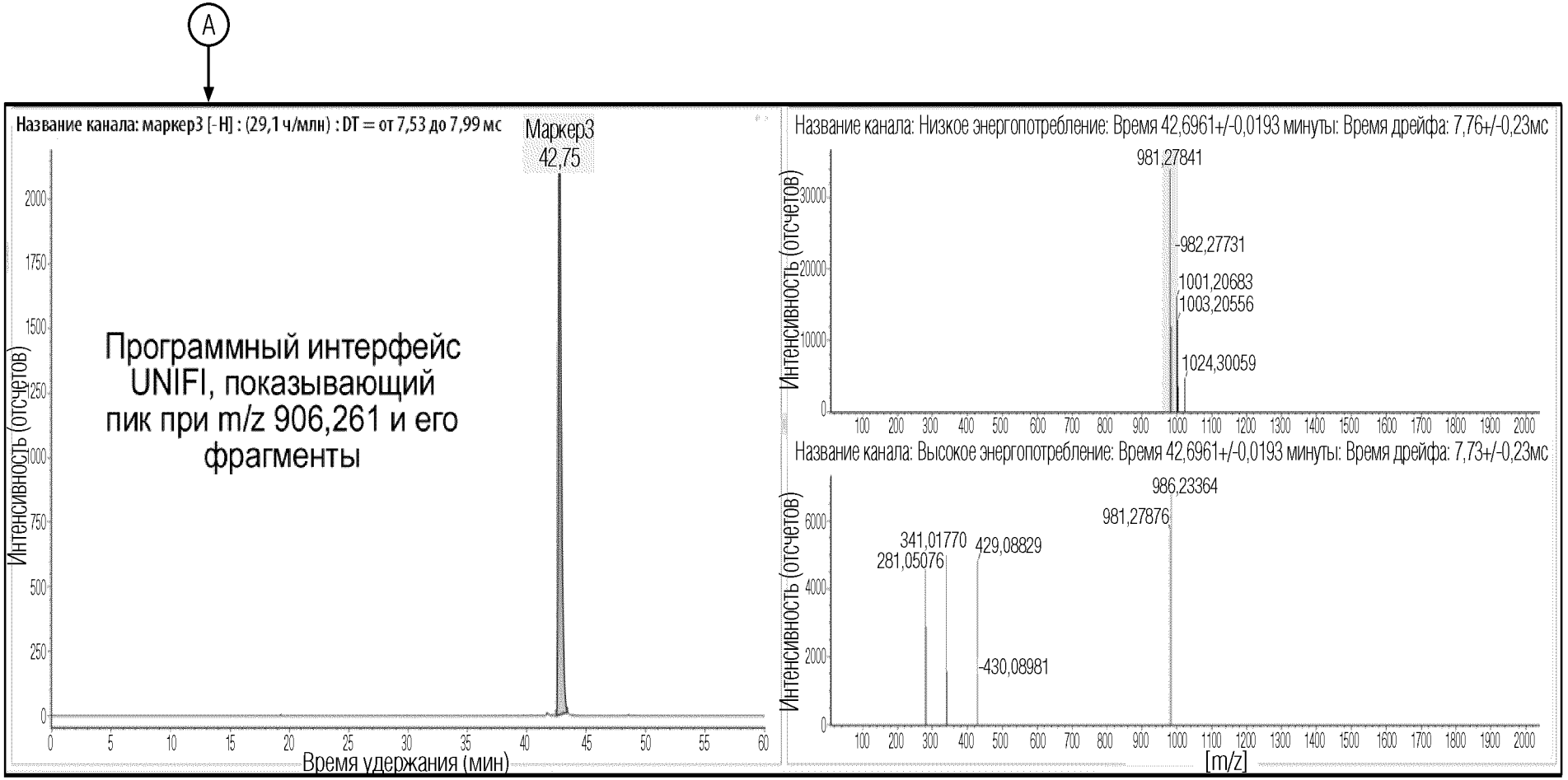
Фиг. 6



ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА


Партии амфолита проанализированы в чистом виде (n=3)
Разделение с полным сканированием колонки C4 (50-2000 m/z)
Компоненты были назначены: в пределах IMS, m/z, допуски RT
Различия партий выявляются и используются для создания библиотеки компонентов
Все партии обрабатываются с использованием библиотеки для оценки различий между партиями
A
Интенсивность (отсчетов)
Многократный S-график анализа показывает различия между партиями

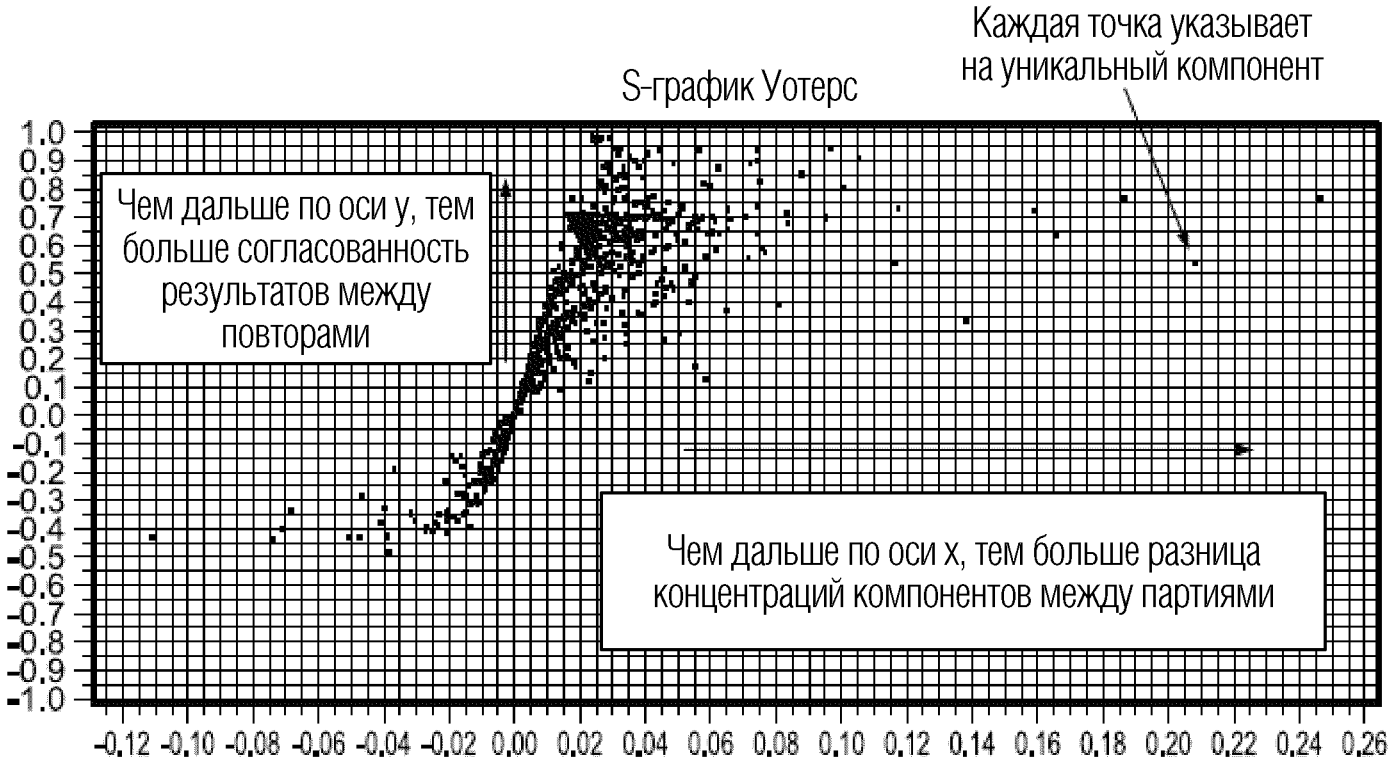
ФИГ. 7



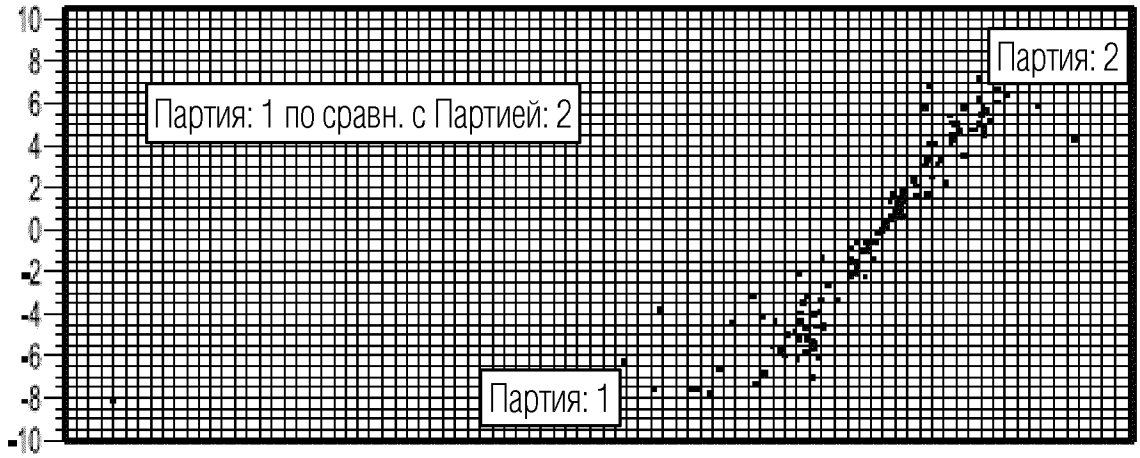
ФИГ. 7 (продолжение)

Партии амфолита GE
1
2
3
4
5

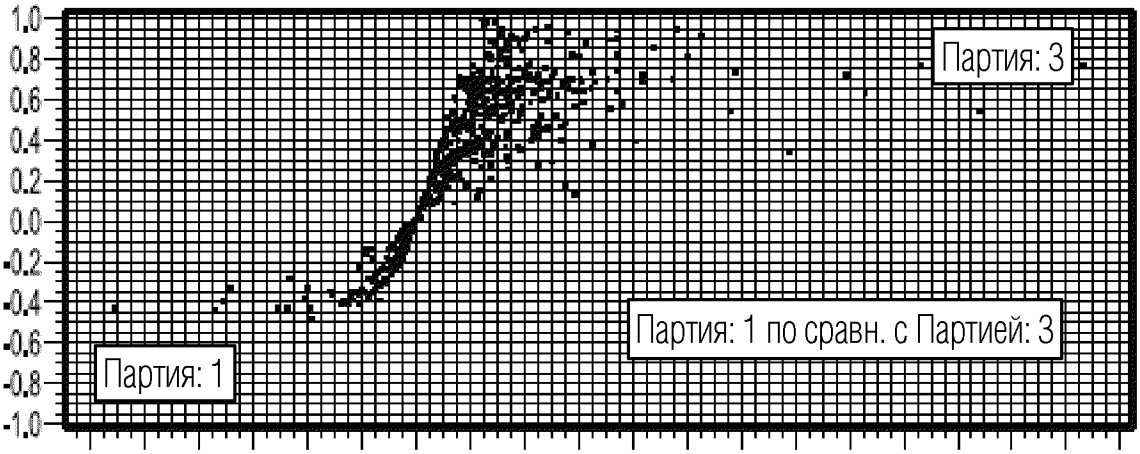
ФИГ. 8A



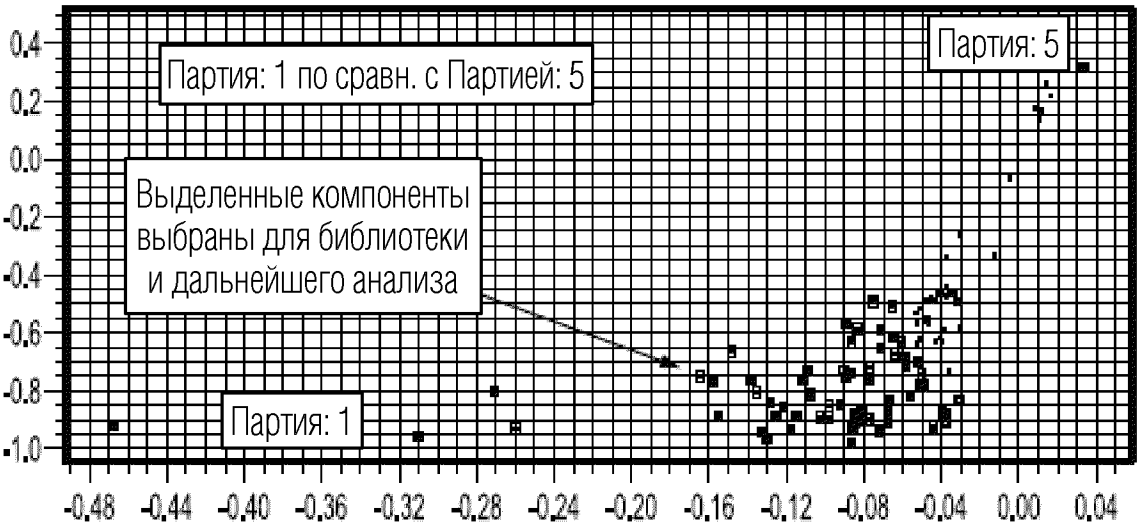
ФИГ. 8B



ФИГ. 9A



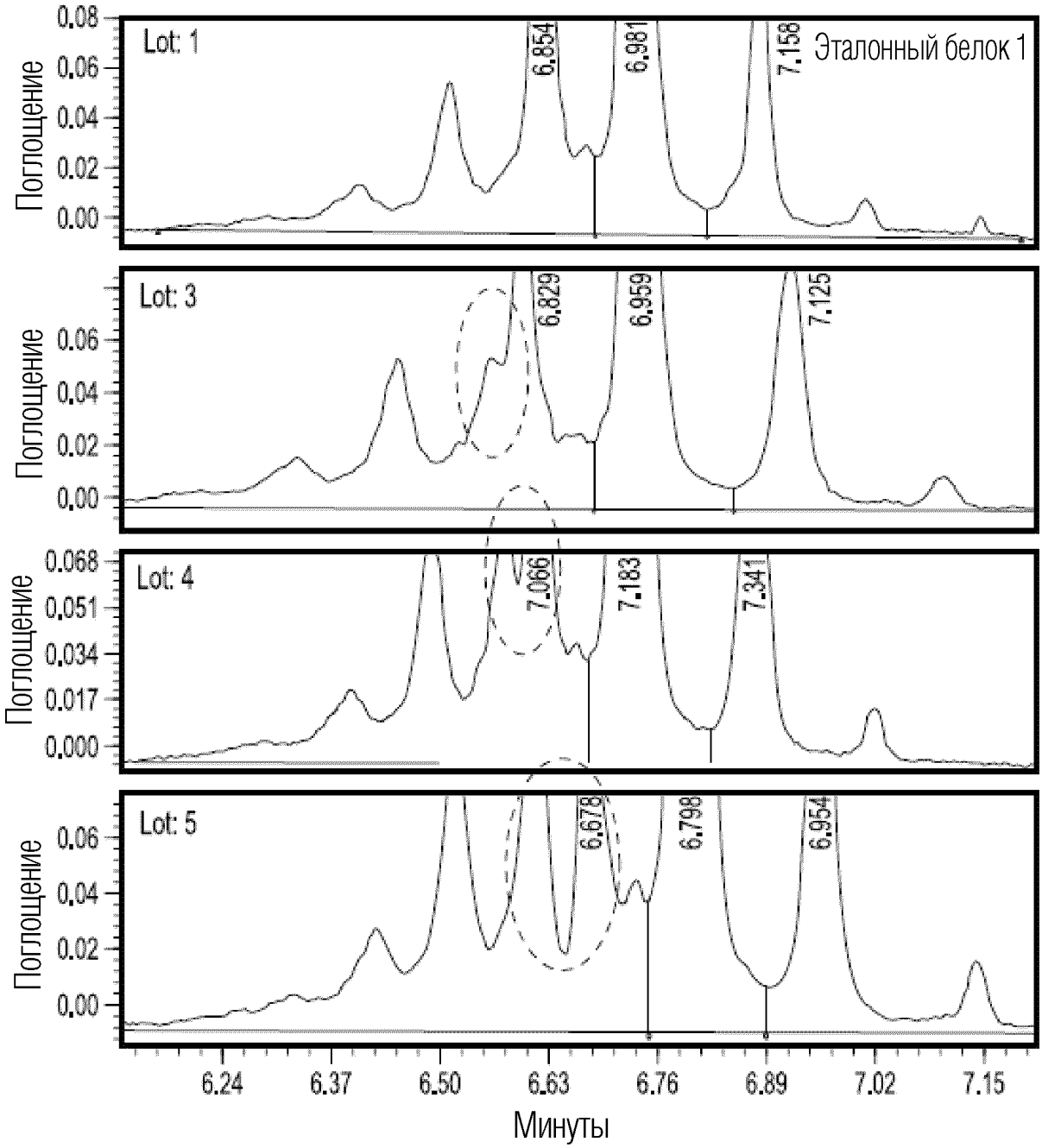
ФИГ. 9B



ФИГ. 9C

значение m/z	Кол-во партий				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
280	100%	65%	35%	16%	24%
319	94%	100%	50%	59%	61%
329	100%	47%	40%	46%	43%
347	100%	67%	50%	31%	25%
373	90%	100%	85%	94%	60%
375	100%	85%	43%	41%	38%
376	100%	92%	50%	42%	25%
431	100%	65%	65%	53%	7%
504	100%	87%	73%	100%	67%
506	100%	100%	71%	85%	71%
508	68%	68%	62%	100%	49%
520	100%	80%	49%	54%	58%
534	100%	100%	59%	50%	40%
562	100%	79%	46%	40%	34%
906	24%	30%	28%	100%	18%
980	67%	94%	100%	33%	53%

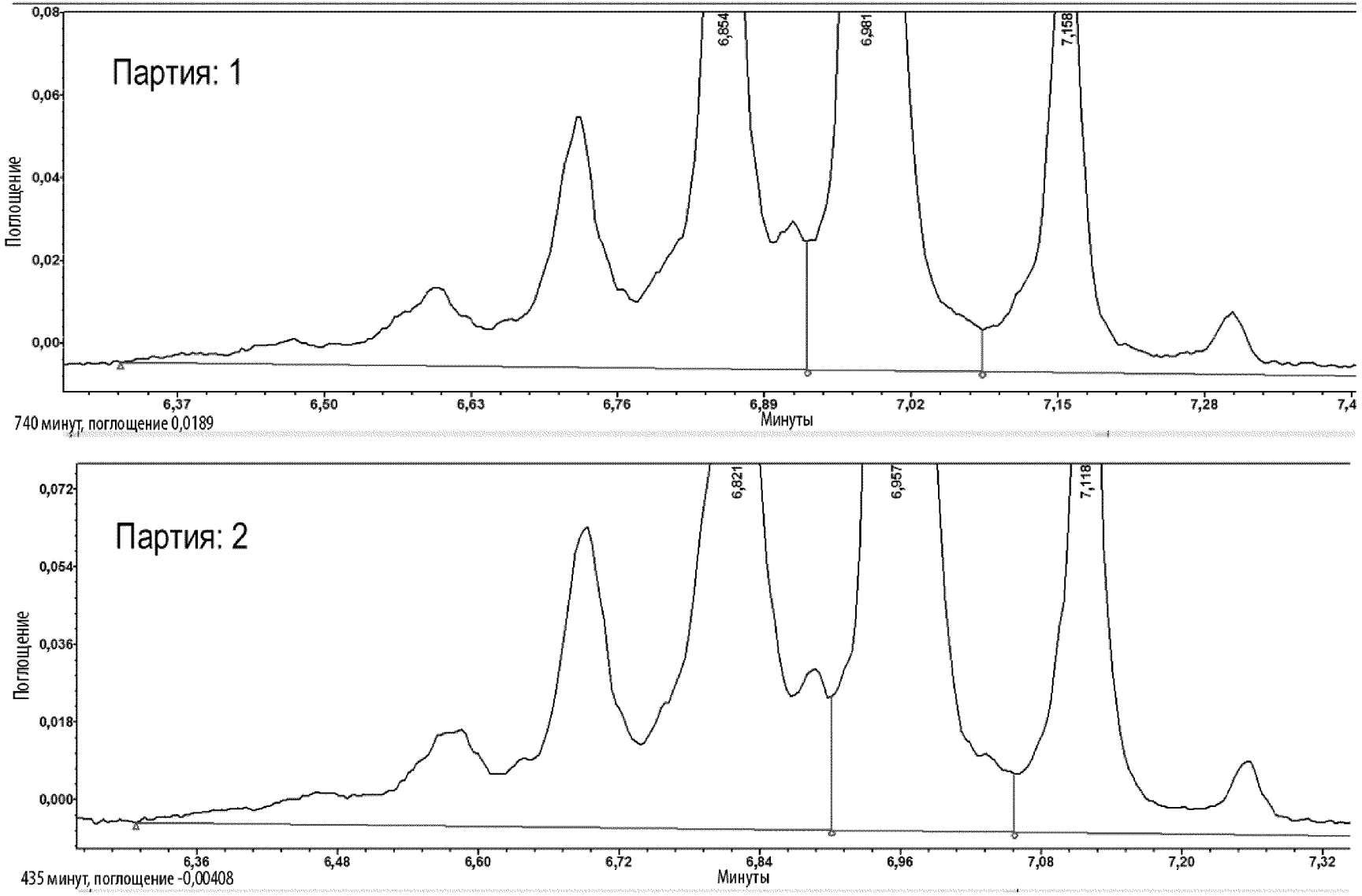
ФИГ. 10А


Lot: 1
6,854
6,981
7,158
Эталонный белок 1
Lot: 3
6,829
6,959
7,125
Lot: 4
7,066
7,183
7,341
Lot: 5
6,678
6,798
6,954
Поглощение
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
0.068
0.051
0.034
0.017
0.000
6.24
6.37
6.50
6.63
6.76
6.89
7.02
7.15
Минуты

ФИГ. 10В

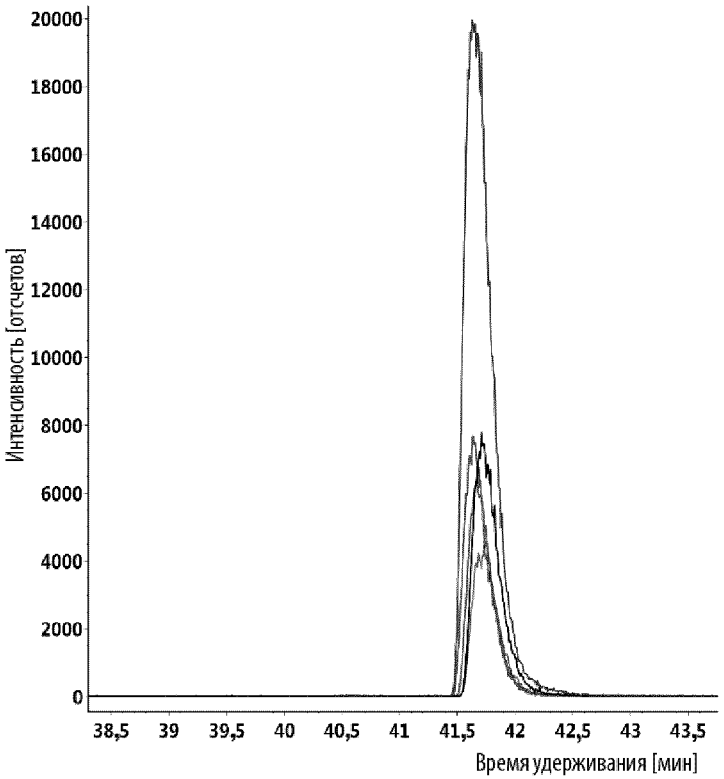
ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

Фиг. 10C



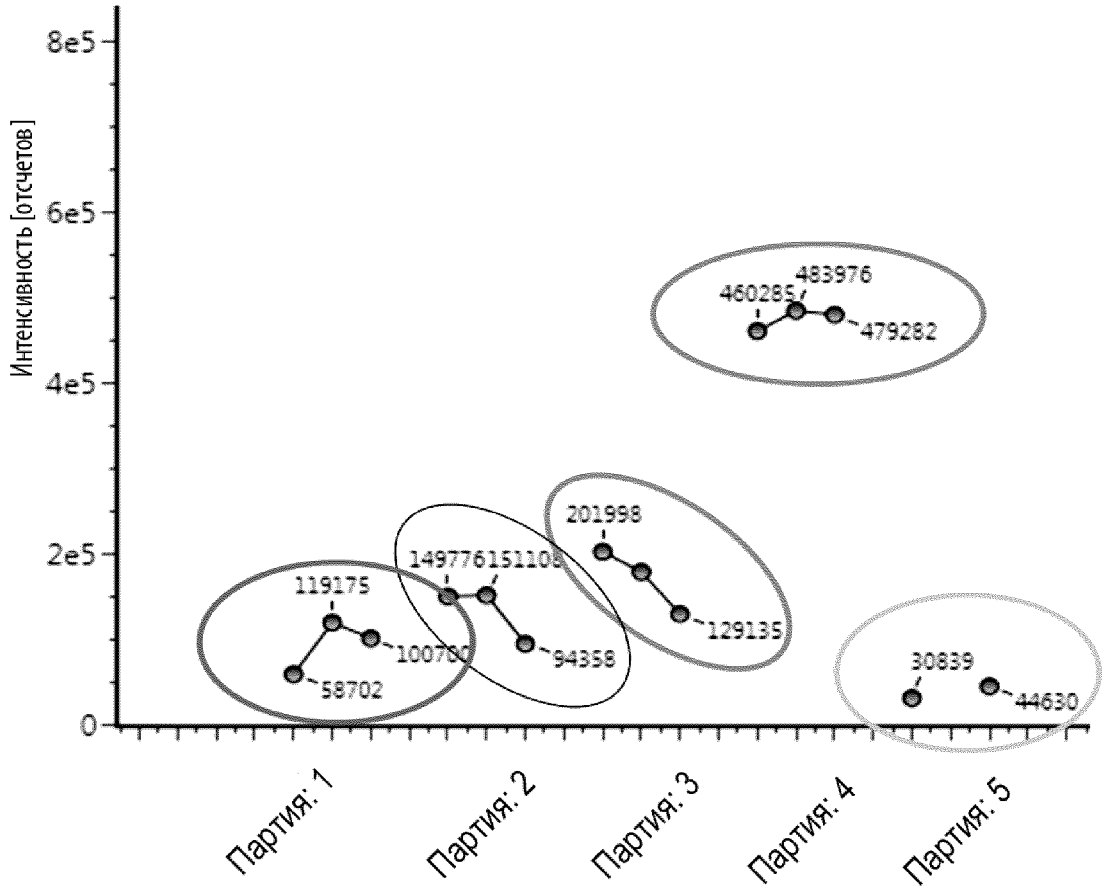
ИЗМЕНЕННАЯ СТРАНИЦА

Фиг. 11A

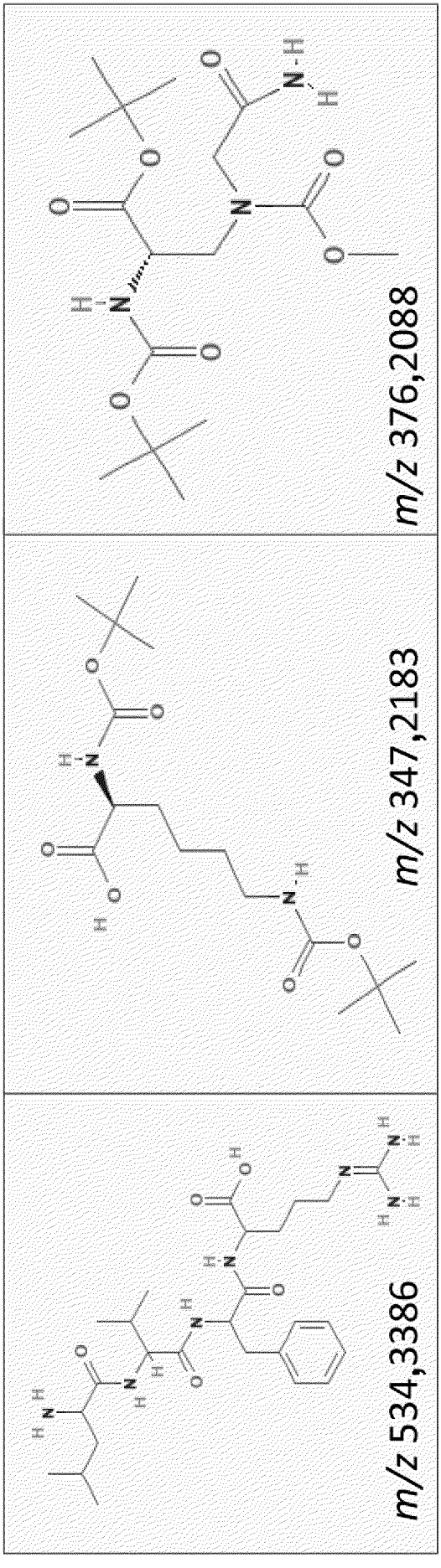


XIC 906,261 *m/z*

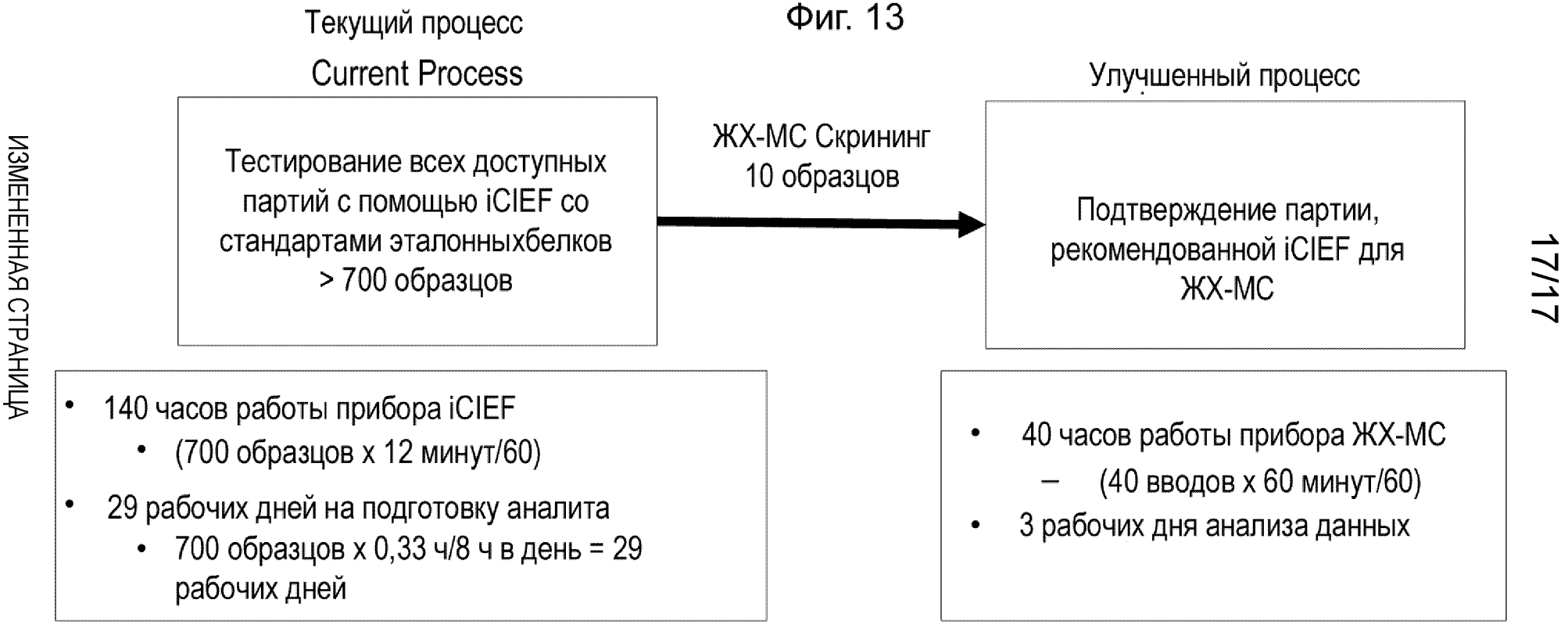
Фиг. 11B



Фиг. 12



Фиг. 13


Текущий процесс
Current Process
Тестирование всех доступных партий с помощью iCIEF со стандартамиэталонныхбелков > 700 образцов
ЖХ-МС Скрининг 10 образцов
Улучшенный процесс
Подтверждение партии, рекомендованной iCIEF для ЖХ-МС
• 140 часов работы прибора iCIEF
• (700 образцов x 12 минут/60)
• 29 рабочих дней на подготовку аналита
• 700 образцов x 0,33 ч/8 ч в день = 29 рабочих дней
• 40 часов работы прибора ЖХ-МС
– (40 вводов x 60 минут/60)
• 3 рабочих дня анализа данных