

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291158 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.28

(22) Дата подачи заявки
2020.10.15

(51) Int. Cl. *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
B01D 15/38 (2006.01)
G01N 27/623 (2021.01)
G01N 27/624 (2021.01)

(54) СПОСОБЫ ДЛЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

(31) 62/915,344; 62/986,324

(32) 2019.10.15; 2020.03.06

(33) US

(86) PCT/US2020/055744

(87) WO 2021/076735 2021.04.22

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

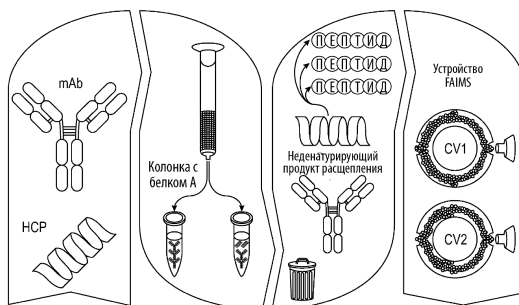
(72) Изобретатель:

Чжэн Сяоцзин, О'Брайен Джонсон
Рейд, Грив Тайлер (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предлагаются способы характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца.



202291158

A1

A1

202291158

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574127EA/042

СПОСОБЫ ДЛЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИИ БЕЛКОВ КЛЕТКИ-ХОЗЯИНА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Данное изобретение в основном относится к характеристике белков клетки-хозяина.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Биофармацевтические продукты на основе белка стали важными лекарственными средствами для лечения рака, аутоиммунных заболеваний, инфекций и кардиометаболических нарушений, и они представляют собой один из наиболее быстрорастущих сегментов продуктов фармацевтической промышленности. Внедрение биотерапевтического препарата на основе белка в клиническую практику может представлять собой длительный процесс, требующий скоординированных усилий в различных областях исследований и разработок, включая открытие, разработку способов и составов, аналитическую характеристику, а также доклинические исследования токсикологии и фармакологии. Биофармацевтические продукты на основе белка должны соответствовать очень высоким стандартам чистоты. Таким образом, может быть важным процесс отслеживания любых примесей в таких биофармацевтических продуктах на разных этапах разработки, изготовления, хранения и обработки лекарственного средства.

Например, в биофармацевтических препаратах на основе белков, которые разрабатываются с применением клеточных систем, могут присутствовать белки клетки-хозяина (НСР). Присутствие НСР в лекарственных препаратах необходимо контролировать, и оно может быть неприемлемым при превышении определенного количества. Аналитические методы анализа для характеристики НСР должны демонстрировать достаточную точность и разрешение. Прямой анализ может требовать выделения продукта в достаточно большом количестве для анализа, что является нежелательным и возможным лишь в отдельных случаях. Следовательно, определить рабочий процесс и аналитические тесты для характеристики НСР в матрице образца при смешивании с чрезвычайно высокой концентрацией активного лекарственного средства является сложной задачей. Из вышеизложенного понятно, что существует потребность в улучшенных способах описания и мониторинга НСР на различных этапах биофармацевтического процесса.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ключевым критерием при разработке биофармацевтических продуктов может быть мониторинг примесей в продукте. Когда такие примеси встречаются, их характеристика составляет важный этап биопроцесса.

Типовые варианты осуществления, описанные в данном документе, удовлетворяют вышеупомянутым требованиям, предоставляя способы характеристики белка(ов) клетки-хозяина.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-

хозяина в матрице образца может включать этап обогащения белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с хроматографической подложкой и проведения этапа фракционирования. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте хроматографическая подложка может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В другом аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В одном аспекте этап фракционирования может представлять собой фракционирование по размеру, фракционирование по гидрофобности, фракционирование по заряду, фракционирование по pI , фракционирование с помощью жидкостной хроматографии или их комбинации. В конкретном аспекте этап фракционирования с помощью жидкостной хроматографии можно проводить с применением обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В еще одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ,

включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В еще одном аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать этап обогащения белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и проведения этапа фракционирования. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В другом аспекте подложка для аффинной хроматографии может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В другом аспекте этап фракционирования может представлять собой фракционирование по размеру, фракционирование по гидрофобности, фракционирование по заряду, фракционирование по pI , фракционирование с помощью жидкостной хроматографии или их комбинации. В конкретном аспекте этап фракционирования с помощью жидкостной хроматографии можно проводить с применением обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

В еще одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по

меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать этап обогащения белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с хроматографической подложкой, выполнения этапа фракционирования и характеристики по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте хроматографическая подложка может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В другом аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может

представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В еще одном аспекте этап фракционирования может представлять собой фракционирование по размеру, фракционирование по гидрофобности, фракционирование по заряду, фракционирование по pI, фракционирование с помощью жидкостной хроматографии или их комбинации. В конкретном аспекте этап фракционирования с помощью жидкостной хроматографии можно проводить с применением обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В еще одном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии. В еще одном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр, соединенный с системой жидкостной хроматографии.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать этап обогащения белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии, выполнение этапа фракционирования и характеристики по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку

образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В другом аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В еще одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В одном аспекте этап фракционирования может представлять собой фракционирование по размеру, фракционирование по гидрофобности, фракционирование по заряду, фракционирование по pI , фракционирование с помощью жидкостной хроматографии или их комбинации. В конкретном аспекте этап фракционирования с помощью жидкостной хроматографии можно проводить с применением обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В еще одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии. В еще одном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр, соединенный с системой жидкостной хроматографии.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать этап обогащения белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с хроматографической

подложкой, выполнения этапа фракционирования и характеристики по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте хроматографическая подложка может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В еще одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В одном аспекте этап фракционирования может представлять собой фракционирование по размеру, фракционирование по гидрофобности, фракционирование по заряду, фракционирование по pI , фракционирование с помощью жидкостной хроматографии или их комбинации. В конкретном аспекте этап фракционирования с помощью жидкостной хроматографии можно проводить с применением обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В еще одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ,

включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать этап обогащения белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии, выполнения этапа фракционирования и характеристики по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В другом аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В другом аспекте этап фракционирования может представлять собой фракционирование по размеру, фракционирование по гидрофобности, фракционирование по заряду, фракционирование по pI, фракционирование с помощью жидкостной хроматографии или их комбинации. В конкретном аспекте этап фракционирования с помощью жидкостной хроматографии можно проводить с применением обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий

этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца, содержащего представляющий интерес белок, может включать этап обогащения белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии, промывки подложки для аффинной хроматографии промывочным буфером и сбор проточной жидкости; а также выполнение этапа фракционирования. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В одном аспекте этап фракционирования может представлять собой фракционирование по размеру, фракционирование по гидрофобности, фракционирование

по заряду, фракционирование по pI , фракционирование с помощью жидкостной хроматографии или их комбинации. В конкретном аспекте этап фракционирования с помощью жидкостной хроматографии можно проводить с применением обращенно-фазовой жидкостной хроматографии.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50%-75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения.

В одном аспекте проточная жидкость может иметь меньшее количество представляющего интерес белка, чем матрица образца.

В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр, соединенный с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью прибора для спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля (FAIMS). В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS-MS. В другом конкретном аспекте указанный способ может дополнительно включать характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью устройства FAIMS в сочетании с LC и MS.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать (a) воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси; и (b) обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с хроматографической подложкой. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной

хроматографии. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте хроматографическая подложка может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр, соединенный с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS-MS. В другом конкретном аспекте указанный способ может дополнительно включать характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью устройства FAIMS в сочетании с LC и MS.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 500% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий

этап (a), но не этап (b).

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 100-1000% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап (a), но не этап (b).

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать (a) воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси; и (b) обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте хроматографическая подложка может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В другом аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В еще одном аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр, соединенный с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать

характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS-MS. В другом конкретном аспекте указанный способ может дополнительно включать характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью устройства FAIMS в сочетании с LC и MS.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 500% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап (a), но не этап (b).

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 100-1000% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап (a), но не этап (b).

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать (a) воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси; (b) обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с хроматографической подложкой и (c) характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В другом конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может содержать белок А или белок G. В еще одном конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать сбор проточной жидкости из подложки для аффинной хроматографии.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к

агентам или путем добавления агентов к образцам.

В одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В другом аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии. В еще одном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр, соединенный с системой жидкостной хроматографии.

В еще одном аспекте указанный способ может дополнительно включать характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS-MS. В другом конкретном аспекте указанный способ может дополнительно включать характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью устройства FAIMS в сочетании с LC и MS.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 500% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап (a), но не этап (b).

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 100-1000% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап (a), но не этап (b).

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать (a) воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси; (b) обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и (c) характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку

образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В другом аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В другом аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В еще одном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии. В еще одном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр, соединенный с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS-MS. В другом конкретном аспекте указанный способ может дополнительно включать характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью устройства FAIMS в сочетании с LC и MS.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 500% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап (a), но не этап (b).

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 100-1000% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап (a), но не этап (b).

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с хроматографической подложкой и характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте

хроматографическая подложка может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 30% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 30% - 75% больше белков клетки-хозяина по сравнению со способом, не включающим спектрометрию ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 30% больше белков клетки-хозяина по сравнению со способом, не включающим спектрометрию ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

В другом аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 30% - 75% больше белков клетки-хозяина по сравнению со способом, не включающим спектрометрию ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать (а) воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси; (b) обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с хроматографической подложкой и (с) характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии. В конкретном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте хроматографическая подложка может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка

может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой тандемный масс-спектрометр, соединенный с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS-MS. В другом конкретном аспекте указанный способ может дополнительно включать характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью устройства FAIMS в сочетании с LC и MS.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 15% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этапы (a) и (b), но не этап (c).

В еще одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 15%-60% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этапы (a) и (b), но не этап (c).

В одном типовом варианте осуществления способ характеризации белков клетки-хозяина в матрице образца может включать (a) воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси; (b) обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и (c) характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В одном аспекте подложка для аффинной хроматографии может представлять собой подложку для хроматографии с белком А. В одном аспекте хроматографическая подложка

может содержать белок А или белок G. В конкретном аспекте белок А или белок G можно иммобилизовать на агарозной или сефарозной смоле.

В одном аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки промывочным буфером и сбор проточной жидкости. В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать промывку хроматографической подложки элюирующим буфером и сбор элюированных фракций.

В другом аспекте этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу восстанавливающего агента. В одном аспекте обработка может включать добавление к образцу алкилирующего агента. В другом аспекте обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В одном аспекте матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В конкретном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии. В другом конкретном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр, соединенный с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте указанный способ может дополнительно включать определение характеристик по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS-MS. В другом конкретном аспекте указанный способ может дополнительно включать характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью устройства FAIMS в сочетании с LC и MS.

В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 15% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этапы (a) и (b), но не этап (c).

В еще одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 15%-60% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этапы (a) и (b), но не этап (c).

Эти и другие аспекты изобретения будут лучше оценены и поняты при

рассмотрении вместе со следующим описанием и прилагаемыми графическими материалами. Следующее описание, хотя и указывает на различные варианты осуществления и их многочисленные конкретные детали, предусмотрено в качестве иллюстрации, а не ограничения. Многие замены, модификации, добавления или перестановки могут быть выполнены в пределах объема настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 продемонстрировано количество белков и уникальных пептидов, охарактеризованных в матрице образца с помощью хроматографии без белка А и хроматографии с белком А вместе со статистикой воспроизводимости способов, выполненных в соответствии с типовыми вариантами осуществления.

На Фиг. 2 продемонстрирован протокол этапа фракционирования, проводимого в соответствии с типовым вариантом осуществления.

На Фиг. 3 продемонстрировано количество белков и уникальных пептидов, охарактеризованных в матрице образца с помощью способа без этапа фракционирования и с этапом фракционирования вместе со статистикой воспроизводимости способов, выполненных в соответствии с типовыми вариантами осуществления.

На Фиг. 4 продемонстрировано количество белков и уникальных пептидов, охарактеризованных в матрице образца с помощью способа с этапом хроматографии с белком А и с помощью способа с этапом хроматографии с белком А и этапом фракционирования вместе со статистикой воспроизводимости способов, выполненных в соответствии с типовыми вариантами осуществления.

На Фиг. 5 продемонстрировано количество белков и уникальных пептидов, охарактеризованных в матрице образца с помощью способа, в котором проводилось нормальное расщепление белка, и с помощью способа, в котором проводилось нативное расщепление белка, вместе со статистикой воспроизводимости способов, выполненных в соответствии с типовыми вариантами осуществления.

На Фиг. 6 продемонстрировано количество белков и уникальных пептидов, охарактеризованных в матрице образца, помещенного в нативные условия с помощью способа хроматографии без белка А и способа хроматографии с белком А вместе со статистикой воспроизводимости способов, выполненных в соответствии с типовыми вариантами осуществления.

На Фиг. 7 продемонстрировано количество белков и уникальных пептидов, охарактеризованных в матрице образца с помощью способа без устройства FAIMS и способа с устройством FAIMS вместе со статистикой воспроизводимости способов, выполненных в соответствии с типовыми вариантами осуществления.

На Фиг. 8 продемонстрировано количество белков и уникальных пептидов, охарактеризованных в матрице образца с помощью способа, включающего хроматографию с белком А без устройства FAIMS и с устройством FAIMS вместе со статистикой воспроизводимости способов, выполненных в соответствии с типовыми вариантами осуществления.

На Фиг. 9 продемонстрировано количество и перекрытие НСР, обнаруженных при анализе в соответствии с типовым вариантом осуществления: (А) продукты нативного расщепления по сравнению с продуктами нормального расщепления, (В) продукты нормального расщепления по сравнению с деплетированными по белку А, (С) продукты нативного расщепления по сравнению с деплетированными по белку А, (D) продукты нативного расщепления, деплетированные по белку А с FAIMS и без нее, и (Е) оптимизированный способ по сравнению с сообщенными НСР. Все идентифицированные белки имеют 2+ уникальных пептида с 1% пептида FDR и 5% белка FDR.

На Фиг. 10 продемонстрирован пример цикла с FAIMS и без нее, выполненного в соответствии с типовым вариантом осуществления: (А) хроматограммы основного пика для цикла образца с FAIMS (синий, красный и зеленый) и без FAIMS (серый) со вставкой, демонстрирующей DS интерференцию НСР-пептида, (В) спектры фрагментации «выявленного» НСР-пептида. Последовательности пептидов включают K.KLEELDLDEQQR.K (SEQ ID NO. 1), K.VYACEVTHQGLSSPVT.K (SEQ ID NO. 2), и KLEELDLDEQQR (SEQ ID NO. 3)

На Фиг. 11 продемонстрировано количество и перекрытие НСР, обнаруженных в повторных циклах для всех комбинаций способов, опробованных в соответствии с типовыми вариантами осуществления. Все идентифицированные белки имеют 2+ уникальных пептида с 1% пептида FDR и 5% белка FDR.

На Фиг. 12 продемонстрировано количество и перекрытие НСР, обнаруженных в образце нативного расщепления, деплетированного по белку А, с помощью FAIMS (А) по сравнению со всеми другими способами (В-Н). Все идентифицированные белки имеют 2 или большее количество уникальных пептидов с 1% пептида FDR и 5% белка FDR.

На Фиг. 13 продемонстрирован рабочий процесс типового варианта осуществления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Белки клетки-хозяина (НСР) представляют собой класс примесей, которые необходимо удалять из всех белковых терапевтических средств, полученных из клеток. В ходе продуцирования клеток этих терапевтических белков, конечный лекарственный продукт на белковой основе должен быть высокоочищенным, чтобы примеси из клеток находились на приемлемо низком уровне перед клиническим применением. Необходимо контролировать примеси, в частности белки клетки-хозяина (НСР), полученные из системы экспрессии млекопитающих (например, клетки яичника китайского хомяка (CHO)). Общие рекомендации относительно суммарного уровня НСР в готовой лекарственной субстанции предусматривают менее 100 ppm (John H. Chon & Gregory Zarbis-Papastoitsis, *Advances in the production and downstream processing of antibodies*, 28 NEW BIOTECHNOLOGY 458-463 (2011)). НСР представляют проблему как для безопасности пациентов, так и для эффективности лекарственных средств. См. публикации Leslie C. Eaton, *Host cell contaminant protein assay development for recombinant biopharmaceuticals*, 705 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 105-114 (1995); Xing Wang, Alan K. Hunter & Ned M.

Mozier, Host cell proteins in biologics development: Identification, quantitation and risk assessment, 103 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 446-458 (2009); and Christina L. Zuch De Zafra et al., Host cell proteins in biotechnology-derived products: A risk assessment framework, 112 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 2284-2291 (2015). В то время как уровни НСР ниже 100 ppm обычно считаются приемлемыми, риск, ассоциированный с конкретным контаминантом, должен оцениваться индивидуально и может потребовать установления еще более низкого предела обнаружения (Daniel G. Bracewell, Richard Francis & C. Mark Smales, The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control, 112 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 1727-1737 (2015); Tanja Wolter & Andreas Richter, Assays for controlling host-cell impurities in biopharmaceuticals, 40 BIOPROCESS INTERNATIONAL 40-46 (2005).

Многочисленные задокументированные случаи описывают деградацию терапевтических белков или стабилизирующих агентов из-за активности НСР (Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016); Troii Hall et al., Polysorbates 20 and 80 Degradation by Group XV Lysosomal Phospholipase A2 Isomer X1 in Monoclonal Antibody Formulations., 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1633-1642; Sharon X. Gao et al., Fragmentation of a highly purified monoclonal antibody attributed to residual CHO cell protease activity, 108 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 977-982 (2010); Deepti Ahluwalia et al., Identification of a host cell protein impurity in therapeutic protein, P1, 141 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 32-38 (2017); Amareth Lim et al., Characterization of a cathepsin D protease from CHO cell-free medium and mitigation of its impact on the stability of a recombinant therapeutic protein, 34 BIOTECHNOLOGY PROGRESS 120-129 (2017)).

FDA не указывает максимально допустимый уровень НСР, но концентрации НСР в конечном лекарственном препарате должны контролироваться и воспроизводиться от партии к партии (FDA, 1999). Однако, даже когда общее количество примесей НСР присутствует в лекарственном веществе в небольших количествах, следовые количества НСР могут быть неприемлемыми для некоторых конкретных НСР, которые могут вызывать иммунный ответ, будучи токсичными или биологически активными после введения (J.R. Bierich, Treatment of Pituitary Dwarfism with Biosynthetic Growth Hormone, 75 ACTA PAEDIATRICA 13-18 (1986); T. Romer et al., Efficacy and safety of a new ready-to-use recombinant human growth hormone solution, 30 JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 578-589 (2007); Daniel G. Bracewell, Richard Francis & C. Mark Smales, The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control, 112 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 1727-1737 (2015); Saloumeh Kadkhodayan Fischer et al., Specific Immune Response to Phospholipase B-Like 2 Protein, a Host Cell Impurity in Lebrikizumab Clinical Material, 19 THE AAPS JOURNAL 254-263 (2016); Andres H. Gutiérrez, Leonard Moise & Annie S. De Groot, Of

[hamsters] and men, 8 HUMAN VACCINES & IMMUNOTHERAPEUTICS 1172-1174 (2012); Vibha Jawa et al., Evaluating Immunogenicity Risk Due to Host Cell Protein Impurities in Antibody-Based Biotherapeutics, 18 THE AAPS JOURNAL 1439-1452 (2016); Naghmeh Abiri et al., Assessment of the immunogenicity of residual host cell protein impurities of OsrHSA, 13 PLOS ONE (2018)). Также может быть неприемлемым, если НСР обладают способностью расщеплять антитела или изменять способность связывания антител (Nitin Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016); Troii Hall et al., Polysorbates 20 and 80 Degradation by Group XV Lysosomal Phospholipase A2 Isomer X1 in Monoclonal Antibody Formulations., 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1633-1642)). Следовательно, желательно разработать способы, позволяющие отслеживать все компоненты НСР по отдельности.

Традиционно для количественной оценки общего содержания НСР применяли иммуноферментный анализ (ELISA) с поликлональными антителами анти-НСР (Denise C. Krawitz et al., Proteomic studies support the use of multi-product immunoassays to monitor host cell protein impurities, 6 PROTEOMICS 94-110 (2006); Catherine Em Hogwood, Daniel G Bracewell & C Mark Smales, Host cell protein dynamics in recombinant CHO cells, 4 BIOENGINEERED 288-291 (2013); Anne Luise Tscheliessnig et al., Host cell protein analysis in therapeutic protein bioprocessing - methods and applications, 8 BIOTECHNOLOGY JOURNAL 655-670 (2013)). Учитывая потребность в измерениях отдельных компонентов НСР, ELISA может не быть окончательным инструментом для оценки уровня НСР. Кроме того, некоторые слабоиммуногенные или неиммуногенные НСР могут не продуцировать антитела для обнаружения их с помощью ELISA, поэтому эти НСР не могут быть обнаружены. Несмотря на то, что анализ ELISA является пригодным для контроля процесса и теста на высвобождение, он имеет несколько важных ограничений, в том числе: измерение только общих уровней НСР, невозможность обнаружения новых источников загрязнения и неточность в отношении более иммуногенных белков (Fengqiang Wang, Daisy Richardson, & Mohammed Shameem, Host-cell protein measurement and control, 28 BIOPROCESS INTERNATIONAL 32-38 (2015); Judith Zhu-Shimoni et al., Host cell protein testing by ELISAs and the use of orthogonal methods, 111 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 2367-2379 (2014)). Другая сложность заключается в том, что ELISA обычно зависит от антигенов, полученных из клеточных линий, лишенных терапевтического белка (нулевые штаммы), которые могут иметь профиль НСР, существенно отличающийся от продуцируемого штамма. Кроме того, НСР, совместно очищающиеся с терапевтическими белками, которых существует большое количество, могут демонстрировать нелинейный ответ (см. публикации Nabila Aboulaich et al., A novel approach to monitor clearance of host cell proteins associated with monoclonal antibodies, 30 BIOTECHNOLOGY PROGRESS 1114-1124 (2014); Nicholas E. Levy et al., Identification and characterization of host cell protein product-associated impurities in monoclonal antibody bioprocessing, 111 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 904-912 (2013); Nicholas E. Levy et

al., Host cell protein impurities in chromatographic polishing steps for monoclonal antibody purification, 113 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 1260-1272 (2015). Если концентрация НСР в образце намного выше нулевого штамма и антител, способных его распознать, недостаточно, это потенциально может привести к недооценке количества контаминантов. Кроме того, не все НСР могут быть обнаружены с помощью ELISA, поскольку не все белки являются иммуногенными и, следовательно, не имеют ассоциированного антитела. Регулирующие органы осведомлены об этих ограничениях и теперь ожидают, что с помощью ортогональных способов будет возможность обнаруживать определенные контаминанты до процесса изготовления лекарственных средств в больших масштабах. Действительно, дополнительные способы обнаружения НСР теперь обычно применяются не только для лучшего контроля, но и для существенной оптимизации разработки процессов, которые могут обеспечить такие методы (Viktor Hada et al., Recent advancements, challenges, and practical considerations in the mass spectrometry-based analytics of protein biotherapeutics: A viewpoint from the biosimilar industry, 161 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS 214-238 (2018); Kristin N Valente et al., Applications of proteomic methods for CHO host cell protein characterization in biopharmaceutical manufacturing, 53 CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY 144-150 (2018); и Matthew R. Schenauer, Gregory C. Flynn & Andrew M. Goetze, Identification and quantification of host cell protein impurities in biotherapeutics using mass spectrometry, 428 ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 150-157 (2012)).

Для мониторинга НСР использовался ряд дополнительных аналитических подходов, включая 1D/2D-PAGE и аналитическую технологию на основе масс-спектрометрии (Julita K. Grzeskowiak et al., Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparison of affinity and non-affinity based downstream processing of recombinant monoclonal antibody, 1216 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 4902-4912 (2009); Catalin Doneanu et al., Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, 4 MABS 24-44 (2012); Mi Jin et al., Profiling of host cell proteins by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Implications for downstream process development, 105 BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING 306-316 (2010)). Жидкостная хроматография в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS) также может обеспечить инструмент одновременной идентификации и количественного определения примесей НСР и является основным ортогональным способом, дополняющим анализ ELISA. Тем не менее, основная проблема для способов, основанных на масс-спектрометрии, может заключаться в том, что масс-спектрометр сам по себе не способен обнаруживать низкую концентрацию НСР при смешивании с преобладающим и высококонцентрированным антителом в лекарственном веществе. С целью преодоления проблемы широкого динамического диапазона (более 6 порядков) между НСР с низким уровнем ppm и высоким содержанием терапевтических антител, одна из стратегий заключается в разрешении совместно элюирующих пептидов перед масс-спектрометрическим анализом

путем добавления другого измерения разделения, такого как 2D-LC и подвижности ионов в дополнение к определению, зависящему от данных, или определению, независимому от данных, для повышения эффективности разделения. В одном исследовании Ecker et al. сообщили об одноразрядной идентификации уровня ppm НСР с помощью LC-MS/MS с определением, независимым от данных, а также создали библиотеку, включающую массы, время удерживания и фрагментные ионы для НСР из нулевых штаммов. Несмотря на то, что этот способ является чувствительным, он может привести к потере НСР, коэкспрессирующихся только с определенным продуктом (Dawn M Ecker, Susan Dana Jones & Howard L Levine, The therapeutic monoclonal antibody market, 7 MABS 9-14 (2014)). Другое исследование продемонстрировало способность идентифицировать НСР от 10 до 50 ppm с помощью 2D-HPLC (Catalin Doneanu et al., Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry, 4 MABS 24-44 (2012); Donald E. Walker et al., A modular and adaptive mass spectrometry-based platform for support of bioprocess development toward optimal host cell protein clearance, 9 MABS 654-663 (2017)). Однако время цикла 2D-LC очень велико, и этот способ может быть недостаточно чувствительным для анализа более низких уровней НСР (<10 ppm). Кроме того, это обычно предотвращает идентификацию новых контаминантов, снижая пригодность указанного способа (хотя существуют альтернативы, которые могут ограничить этот недостаток) (Veronika Reisinger et al., A mass spectrometry-based approach to host cell protein identification and its application in a comparability exercise, 463 ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 1-6 (2014); Simion Kreimer et al., Host Cell Protein Profiling by Targeted and Untargeted Analysis of Data Independent Acquisition Mass Spectrometry Data with Parallel Reaction Monitoring Verification, 89 ANALYTICAL CHEMISTRY 5294-5302 (2017)).

Также было продемонстрировано, что многомерная хроматография повышает чувствительность, обеспечивая лучшее отделение триптических пептидов НСР от пептидов терапевтического белка (см. публикации Catalin Doneanu et al., *выше*; Matthew R. Schenauer et al., *supra*; G. Joucla et al., Cation exchange versus multimodal cation exchange resins for antibody capture from CHO supernatants: Identification of contaminating Host Cell Proteins by mass spectrometry, 942-943 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B 126-133 (2013; Qingchun Zhang et al., Comprehensive tracking of host cell proteins during monoclonal antibody purifications using mass spectrometry, 6 MABS 659-670 (2014); Amy Farrell et al., Quantitative Host Cell Protein Analysis Using Two Dimensional Data Independent LC-MSE, 87 ANALYTICAL CHEMISTRY 9186-9193 (2015); Feng Yang et al., A 2D LC-MS/MS Strategy for Reliable Detection of 10-ppm Level Residual Host Cell Proteins in Therapeutic Antibodies, 90 ANALYTICAL CHEMISTRY 13365-13372 (2018); Regina Kufer et al., Evaluation of Peptide Fractionation and Native Digestion as Two Novel Sample Preparation Workflows to Improve НСР Characterization by LC-MS/MS, 91 ANALYTICAL CHEMISTRY 9716-9723 (2019)). Например, «offline» фракционирование при высоком pH можно комбинировать с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией при низком pH, чтобы значительно уменьшить комплексность образца. Однако как «offline»-, так и «online»-мультимерная

хроматография не может полностью исключить помехи от терапевтических белков и может значительно снизить пропускную способность образцов, что обуславливает ее непригодность для рутинного анализа во время изготовления. Ионная подвижность, хотя и редко используется для анализа НСР, потенциально может обеспечить дополнительное разделение без снижения пропускной способности образца (см. публикацию Catalin Doneanu et al., *выше*)

Другие стратегии сосредоточены на подготовке матрицы образца для обогащения НСР путем удаления антител из матрицы образца с помощью аффинной очистки, ограниченного расщепления или захвата НСР с применением поликлональных антител (Lihua Huang et al., A Novel Sample matrix Preparation for Shotgun Proteomics Characterization of HCPs in Antibodies, 89 ANALYTICAL CHEMISTRY 5436-5444 (2017); Jenny Heidbrink Thompson et al., Improved detection of host cell proteins (HCPs) in a mammalian cell-derived antibody drug using liquid chromatography/mass spectrometry in conjunction with an HCP-enrichment strategy, 28 RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY 855-860 (2014); James A Madsen et al., Toward the complete characterization of host cell proteins in biotherapeutics via affinity depletions, LC-MS/MS, and multivariate analysis, 7 MABS 1128-1137 (2015)). Удаление терапевтического белка может улучшить обнаружение НСР на несколько порядков, но при этом существует риск искажения результатов или непреднамеренного удаления НСР из образца.

Одной из основных проблем для существующих способов может быть отсутствие возможности обнаружения низких концентраций НСР в матрице образца (например, 0,01-10 ppm) с широким динамическим диапазоном (порядок 5-8) между НСР и лекарственным средством, что может привести к подавлению сигнала НСР при анализе.

Возможность измерять и контролировать тысячи НСР пропорционально увеличивает объем получаемых данных. Будут значительные преимущества, если полученную информацию можно будет использовать для определения критических НСР и, таким образом, создать оптимизированную основу для управления рисками. Разработка такой библиотеки НСР может быть полезной для внутрилабораторного скрининга НСР, регулирования и мониторинга примесей в биофармацевтических процессах, а также для поиска новых целей для разработки лекарственных средств. Библиотеку НСР также можно использовать для подтверждения идентичности НСР в малых количествах в лекарственном веществе или в процессе очистки путем сравнения tandemных масс-спектров и идентичности белков с теми, которые подтверждены наличием в библиотеке. Библиотека DIA для будущих анализов может быть создана на основе масс, времени удерживания и фрагментных ионов, полученных из такого большого количества НСР.

Учитывая ограничения существующих способов, был разработан эффективный и действенный способ идентификации НСР.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы,

подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании, сейчас описаны конкретные способы и материалы. Все упомянутые публикации включены в данный документ посредством ссылки.

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

В некоторых типовых вариантах осуществления, в описании предлагаются способы характеристики белка клетки-хозяина. В данном контексте термин «белок клетки-хозяина» (НСР) включает белок, полученный из клетки-хозяина, и при этом он может не иметь отношения к желаемому белку, представляющему интерес. Белок клетки-хозяина может представлять собой технологическую примесь, которая может образовываться в процессе изготовления, и может включать три основные категории: примеси, происходящие из клеточного субстрата; примеси, происходящие из клеточной культуры, и примеси, происходящие из последующих этапов процесса. Примеси, происходящие из клеточного субстрата, включают, помимо прочего, белки, полученные из организма хозяина, и нуклеиновую кислоту (геномную, векторную или общую ДНК клетки хозяина). Примеси, происходящие из клеточной культуры, включают, помимо прочего, индукторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, происходящие из последующих этапов процесса, включают, помимо прочего, ферменты, химические и биохимические реагенты для обработки (*например*, бромистый цианоген, гуанидин, окисляющие и восстанавливающие агенты), неорганические соли (*например*, тяжелых металлов, мышьяка, иона неметалла), растворители, носители, лиганды (*например*, моноклональные антитела) и другие выщелачиваемые продукты.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок клетки-хозяина может иметь рI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном аспекте рI может составлять около 4,5, около 5,0, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1, около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9, около 8,0, около 8,1, около 8,2, около 8,3, около 8,4, около 8,5, около 8,6, около 8,7, около 8,8, около 8,9 или около 9,0.

В некоторых типовых вариантах осуществления, в описании предлагаются способы характеристики белка клетки-хозяина в матрице образца. В одном аспекте матрица образца может быть получена на любом этапе биопроцесса, таком как жидкость для культивирования клеток (CCF), жидкость для культивирования собранных клеток (HCCF), определение эффективности процесса (PPQ), на любом этапе последующей обработки, лекарственное вещество (DS) или лекарственный продукт (DP), содержащий конечный составленный продукт. В другом аспекте матрица образца может быть выбрана на любом этапе последующего процесса: осветления, хроматографической очистки, вирусной инактивации или фильтрации. Еще в одном аспекте лекарственный продукт может быть

выбран из изготовленного лекарственного продукта в ходе клинического применения, транспортировки, хранения или обращения.

В некоторых типовых вариантах осуществления типов белков клетки-хозяина в композиции может быть по меньшей мере два.

В некоторых типовых вариантах осуществления матрица образца может дополнительно содержать белок, представляющий интерес. В данном контексте термин «белок» или «белок, представляющий интерес» может включать любой аминокислотный полимер с ковалентно связанными амидными связями. Белки содержат одну или большее количество аминокислотных полимерных цепочек, широко известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, родственных с встречающимися в природе структурными вариантами и их синтетическими не встречающимися в природе аналогами, связанными посредством пептидных связей, родственных с встречающимися в природе структурными вариантами, и их синтетическими не встречающимися в природе аналогами. «Синтетические пептиды или полипептиды» относятся к не встречающимся в природе пептиду или полипептиду. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с помощью автоматического синтезатора полипептидов. Специалисту в данной области техники известны различные способы твердофазного пептидного синтеза. Белок может содержать один или множество полипептидов с образованием единой функционирующей биомолекулы. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, применяемых в исследованиях или терапии, белков-ловушек и других Fc-слитых белков химерного рецептора, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител и биспецифических антител. В другом типовом аспекте белок может включать фрагменты антитела, нанотела, химеры рекомбинантного антитела, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с помощью систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как система бакуловирусов насекомых, системы дрожжей (*например*, *Pichia* sp.), системы млекопитающих (*например*, CHO-клетки и производные CHO-клеток, такие как CHO-K1-клетки). Для ознакомления с недавним обзором биотерапевтических белков и их получения см. публикацию Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," (Darius Ghaderi et al., Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147-176 (2012)). В одном аспекте белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Данные модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (*например*, N-ацетилгалактозамин, галактозу, нейраминовую кислоту, N-ацетилглюкозамин, фукозу, маннозу и другие моносахариды), PEG, полигистидин, FLAGtag, мальтоза-связывающий белок (MBP), хитин-связывающий белок (CBP), глутатион-S-трансферазу (GST) мус-эпитоп, флуоресцентные метки и другие красители и

т. п. Белки могут быть классифицированы на основании композиций и растворимости и, таким образом, могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и фибриллярные белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопротейны, гликопротейны, мукопротейны, хромопротейны, фосфопротейны, металлопротейны и липопротейны; и производные белки, такие как первичные производные белки и вторичные производные белки. В одном аспекте представляющий интерес белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, слитый белок или их комбинации.

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

В данном контексте термин «антитело» также включает антигенсвязывающие фрагменты молекул полного антитела. Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п., применяемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, ферментативно получаемый, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфично связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с помощью любых пригодных стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, включающие обработку и экспрессию ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с помощью методик

молекулярной биологии, например, для размещения одного или большего количества переменных и/или константных доменов в пригодной конфигурации или для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. д.

В данном контексте термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или переменная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, помимо прочего, фрагмент Fab, фрагмент Fab', фрагмент F(ab')₂, фрагмент scFv, фрагмент Fv, димер dsFv, фрагмент dAb, фрагмент Fd', фрагмент Fd и область выделенной области, определяющей комплементарность (CDR), а также триател, тетрател, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагменты Fv представляют собой комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а ScFv-белки представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. В некоторых типовых вариантах осуществления фрагмент антитела содержит достаточную аминокислотную последовательность исходного антитела, фрагментом которого он является, который связывается с тем же антигеном, что и исходное антитело; в некоторых типовых вариантах осуществления фрагмент связывается с антигеном с аффинностью, сравнимой с аффинностью исходного антитела, и/или конкурирует с исходным антителом за связывание с антигеном. Фрагмент антитела можно получить любым способом. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим путем с помощью фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем из гена, кодирующего частичную последовательность антитела. В альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. В альтернативном или дополнительном варианте фрагмент антитела может содержать множество цепей, которые связаны вместе, например, с помощью дисульфидных связей. Фрагмент антитела может необязательно содержать многомолекулярный комплекс. Функциональный фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере около 50 аминокислот и более типично содержит по меньшей мере около 200 аминокислот.

Термин «биспецифическое антитело» включает антитело, способное селективно связывать два или большее количество эпитопов. Биспецифические антитела обычно включают две разные тяжелые цепи, каждая из которых специфически связывается с разными эпитопами - либо с двумя разными молекулами (*например*, антигенами) или с той же молекулой (*например*, на том же антигене). Если биспецифическое антитело способно селективно связывать два разных эпитопа (первый эпитоп и второй эпитоп), аффинность первой тяжелой цепи к первому эпитопу, как правило, будет на один-два, три или четыре порядка ниже, чем аффинность первой тяжелой цепи ко второму эпитопу, и

наоборот. Эпитопы, распознаваемые биспецифическим антителом, могут находиться на одной или разных мишенях (*например*, на том же или другом белке). Биспецифические антитела могут быть получены, например, посредством объединения тяжелых цепей, распознающих разные эпитопы одного и того же антигена. Например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие вариабельные последовательности тяжелой цепи, которые распознают различные эпитопы на том же антигене, могут быть слиты с последовательностями нуклеиновых кислот, кодирующими различные константные области тяжелой цепи, и такие последовательности могут экспрессироваться в клетке, которая экспрессирует легкую цепь иммуноглобулина.

Типовое биспецифическое антитело имеет две тяжелые цепи, каждая из которых имеет три CDR тяжелой цепи, за которыми следуют домен C_{H1} , шарнирная область, домен C_{H2} , домен C_{H3} , а также легкую цепь иммуноглобулина, которая либо не придает антигенсвязывающей специфичности, но может связываться с каждой тяжелой цепью, либо которая может связываться с каждой тяжелой цепью, и которая может связывать один или большее количество эпитопов, связанных антигенсвязывающими областями тяжелой цепи, или которая может связываться с каждой тяжелой цепью и обеспечивать связывание одной или обеих тяжелых цепей с одним или обоими эпитопами. BsAb можно разделить на два основных класса: те, которые содержат Fc-область (IgG-подобные), и те, которые не имеют Fc-области, причем последняя обычно меньше, чем IgG и IgG-подобные биспецифические молекулы, содержащие Fc. IgG-подобные bsAb могут иметь разные форматы, такие как, помимо прочего, «triomab», «выступы во впадины» IgG (kih IgG), «crossMab», orth-Fab IgG, двойные вариабельные домены Ig (DVD-Ig), Fab два-в-одном или двойного действия (DAF), IgG-одноцепочечный Fv (IgG-scFv) или $\kappa\lambda$ -тельца. Не являющиеся IgG-подобными различные форматы включают тандемные scFv, формат диатела, одноцепочечное диатело, тандемные диатела (TandAb), ретаргетирующую молекулу с двойной аффинностью (DART), DART-Fc, нанотела или антитела, продуцируемые посредством способа dock-and-lock (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific antibodies and their applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265-310 (2014)).

Способы получения bsAb не ограничиваются квадромной технологией, основанной на соматическом слиянии двух разных клеточных линий гибридомы, химической конъюгации, которая включает химические перекрестные линкеры, и генетическими подходами, в которых применяется технология рекомбинантной ДНК. Примеры bsAb включают описанные в следующих патентных заявках, которые включены в данный документ посредством ссылки: США № 12/823838, подана 25 июня 2010 г.; США № 13/488628, подана 5 июня 2012 г.; США № 14/031075, подана 19 сентября 2013 г.; США № 14/808171, подана 24 июля 2015 г.; США № 15/713574, подана 22 сентября 2017 г.; США № 15/713569, подана 22 сентября 2017 г.; США № 15/386453, подана 21 декабря 2016 г.; США № 15/386443, подана 21 декабря 2016 г.; США № 15/22343 подана 29 июля 2016 г.;

США № 15814095, подана 15 ноября 2017 г. Низкие уровни примесей гомодимера могут присутствовать на нескольких этапах изготовления биспецифических антител. Обнаружение таких примесей гомодимеров может быть проблематичным при выполнении с применением анализа интактной массы вследствие низкого содержания примесей гомодимеров и совместной элюции данных примесей с основными видами при проведении с применением обычного способа жидкостной хроматографии.

В данном контексте термин «мультиспецифическое антитело» или «Mab» относится к антителу со связывающей специфичностью по меньшей мере для двух различных антигенов. Несмотря на то, что такие молекулы обычно связывают только два антигена (*т.е.* биспецифические антитела, bsAb), антитела с дополнительной специфичностью, такие как триспецифические антитела и триспецифические КИ, также могут быть рассмотрены для применения в системе и способе, описанных в данном документе.

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

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления белок, представляющий интерес, может иметь pI в диапазоне от около 4,5 до около 9,0. В одном аспекте pI может составлять около 4,5, около 5,0, около 5,5, около 5,6, около 5,7, около 5,8, около 5,9, около 6,0, около 6,1, около 6,2, около 6,3, около 6,4, около 6,5, около 6,6, около 6,7, около 6,8, около 6,9, около 7,0, около 7,1, около 7,2, около 7,3, около 7,4, около 7,5, около 7,6, около 7,7, около 7,8, около 7,9, около 8,0, около 8,1, около 8,2, около 8,3, около 8,4, около 8,5, около 8,6, около 8,7, около 8,8, около 8,9 или около 9,0.

В некоторых типовых вариантах осуществления типов белка, представляющего интерес, в матрице образца может быть по меньшей мере два. В одном аспекте один из по меньшей мере двух представляющих интерес белков может представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антитела, слитый белок или комплекс антитело-лекарственное средство. В некоторых других вариантах осуществления концентрация одного из по меньшей мере двух представляющих интерес белков может составлять от около 20 мг/мл до около 400 мг/мл. В некоторых типовых вариантах осуществления в композициях существует два типа белка, представляющего интерес. В некоторых типовых вариантах осуществления в композициях существует три типа белка, представляющего интерес. В некоторых типовых вариантах осуществления в композициях существует пять типов белка, представляющего интерес.

В некоторых типовых вариантах осуществления два или большее количество представляющих интерес белка в композиции могут быть выбраны из белков-ловушек, химерных белков, слитых с рецептором Fc, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, человеческих антител, биспецифических антител, мультиспецифических антител, фрагментов антител, нанотел, химер рекомбинантных антител, цитокинов, хемокинов или пептидных гормонов.

В некоторых типовых вариантах осуществления матрица образца может представлять собой совместный состав.

В некоторых типовых вариантах осуществления белок, представляющий интерес, может быть очищен из клеток млекопитающих. Клетки млекопитающего могут быть человеческого происхождения или не человеческого происхождения, могут включать первичные эпителиальные клетки (*например*, кератиноциты, клетки эпителия шейки матки, клетки бронхиального эпителия, клетки эпителия трахеи, клетки эпителия почек и клетки эпителия сетчатки), устойчивые клеточные линии и их штаммы (*например*, 293 эмбриональные клетки почек, клетки BHK, HeLa клетки эпителия шейки матки и клетки сетчатки PER-C6, клетки MDBK (NBL-1), клетки 911, клетки CRFK, клетки MDCK, клетки CHO, клетки BeWo, клетки Chang, клетки Detroit 562, клетки HeLa 229, клетки HeLa S3, клетки Hep-2, клетки KB, клетки LS 180, клетки LS 174T, клетки NCI-H-548, клетки RPMI 2650, клетки SW-13, клетки T24, WI-28 VA13, клетки 2RA, клетки WISH, клетки BS-C-1, клетки LLC-MK2, клетки Clone M-3, клетки 1-10, клетки RAG, клетки TCMK-1, клетки Y-1, клетки LLC-PK1, клетки PK(15), клетки GH_i, клетки GH₃, клетки L2, клетки LLC-RC 256, клетки MHiCi, клетки XC, клетки MDOK, клетки VSW и клетки TH-1, клетки B1, клетки BSC-1, клетки RAf, RK-клетки, клетки PK-15 или их производные), клетки фибробластов из любой ткани или органа (включая, помимо прочего, сердце, печень, почки, толстую кишку, кишечник, пищевод, желудок, нервную ткань (головного, спинного мозга), легкое, сосудистую ткань (артерию, вену, капилляр), лимфоидную ткань (лимфатическую железу, аденоид, миндалину, костный мозг и кровь), селезенку и фибробластные и фибробластоподобные клеточные линии (*например*, клетки CHO, клетки TRG-2, клетки IMR-33, клетки Don, клетки GHK-21, клетки цитруллинемии, клетки Dempsey, клетки Detroit 551, клетки Detroit 510, клетки Detroit 525, клетки Detroit 529, клетки Detroit 532, клетки Detroit 539, клетки Detroit 548, клетки Detroit 573, клетки HEL 299, клетки IMR-90, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки WI-26, клетки Midi, клетки CHO, клетки CV-1, клетки COS-1, клетки COS-3, клетки COS-7, клетки Vero, клетки DBS-FrhL-2, клетки BALB/3T3, клетки F9, клетки SV-T2, клетки M-MSV-BALB/3T3, клетки K-BALB, клетки BLO-11, клетки NOR-10, клетки C3H/10T1/2, клетки HSDMiC3, клетки KLN205, клетки McCoy, L-клетки мыши, клетки штамма 2071 (L-клетки мыши), клетки штамма L-M (L-клетки мыши), клетки L-MTK' (L-клетки мыши), клоны NCTC 2472 и 2555, клетки SCC-PSA1, клетки Swiss/3T3, клетки индийского мунджака, клетки SIRC, клетки Cn и клетки Jensen, Sp2/0, клетки NS0, NS1 или их производные).

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка

клетки-хозяина может включать обогащение белками клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с хроматографической подложкой.

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

В некоторых типовых вариантах осуществления хроматографическая подложка может представлять собой подложку для жидкостной хроматографии. В данном контексте термин «жидкостная хроматография» относится к процессу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального разделения химических единиц при их протекании вокруг или через стационарную жидкость или твердую фазу. Неограничивающие примеры жидкостной хроматографии включают обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию со смешанным режимом или гидрофобную хроматографию.

В данном контексте термин «ионообменная хроматография» может относиться к разделению, включая любой способ, посредством которого два вещества разделяются на основании разности их соответствующих ионных зарядов, либо на молекуле, представляющей интерес, и/или хроматографическом материале в целом, либо локально в специфических областях молекулы, представляющей интерес, и/или хроматографического материала, и таким образом, можно применять либо катионообменный материал, либо анионообменный материал. Ионообменная хроматография обеспечивает разделение молекул на основе различий между локальными зарядами молекул, представляющих интерес, и локальными зарядами хроматографического материала. Упакованная ионообменная хроматографическая колонка или ионообменное мембранное устройство может работать в режиме связывания-элюирования, режиме проточной жидкости или

гибридном режиме. После промывки колонки или мембранного устройства буфером для уравнивания или другим буфером с другим рН и/или проводимостью, восстановление продукта может быть достигнуто за счет увеличения ионной силы (*т.е.*, проводимости) элюирующего буфера для конкурирования с растворенным веществом за заряженные участки ионообменной матрицы. Изменение рН и, следовательно, изменение заряда растворенного вещества может представлять собой другой способ достижения элюирования растворенного вещества. Изменение проводимости или рН может быть постепенным (градиентное элюирование) или ступенчатым (ступенчатое элюирование). Затем колонку можно регенерировать перед следующим использованием. Анионные или катионные заместители могут быть присоединены к матрицам в порядке получения анионных или катионных подложек для хроматографии. Неограничивающие примеры анионообменных заместителей включают диэтиламиноэтильную (DEAE), четвертичную аминоэтильную (QAE) и четвертичную амино-(Q) группы. Катионные заместители включают карбоксиметил (CM), сульфэтил (SE), сульфопропил (SP), фосфат (P) и сульфонат (S). Целлюлозные ионообменные среды или подложка могут включать DE23™, DE32™, DE52™, CM-23™, CM-32™, и CM-52™, доступные от компании Whatman Ltd, Мейдстон, Кент, Великобритания. Также известны сшитые и полученные на основе SEPHADEX® ионообменные материалы. Например, DEAE-, QAE-, CM- и SP-SEPHADEX® и DEAE-, Q-, CM- и S-SEPHAROSE® и SEPHAROSE® Fast Flow, и Capto™ S, все из которых доступны от компании GE Healthcare. Кроме того, DEAE- и CM-derivatизированные сополимеры этиленгликоля и метакрилата, такие как TOYOPEARL™ DEAE-650S или M и TOYOPEARL™ CM-650S или M доступны от компаний Toso Haas Co., Филадельфия, штат Пенсильвания, или Nuvia S и UNOSphere™ S от BioRad, Геркулес, штат Калифорния, Eshmuno® S от EMD, Миллипор, штат Массачусетс.

В данном контексте термин «смола для хроматографии гидрофобного взаимодействия» могут включать твердую фазу, которая может быть ковалентно модифицирована фенилом, октилом, бутилом. При такой хроматографии могут применяться свойства гидрофобности для отделения молекул друг от друга. При проведении этого типа хроматографии к стационарной колонке могут быть присоединены гидрофобные группы, такие как фенил, октил, гексил или бутил. Молекулы, которые проходят через колонку и имеют гидрофобные боковые цепи аминокислот на своей поверхности, способны взаимодействовать с гидрофобными группами на колонке и связываться с ними. Примеры смол для хроматографии гидрофобного взаимодействия или подложки включают фенил-сефарозу FF, капто-фенил (GE Healthcare, Упсала, Швеция), фенил 650-M (Tosoh Bioscience, Токио, Япония) и фенил Sartobind (Sartorius Corporation, Нью-Йорк, США).

В данном контексте термин «хроматография со смешанным режимом (MMC)» или «хроматография на мультимодальных разделительных матрицах» включает хроматографический способ, в котором растворенные вещества взаимодействуют со стационарной фазой посредством более чем одного режима или механизма

взаимодействия. ММС можно применять в качестве альтернативного или комплементарного инструмента к традиционной обращенно-фазовой (RP), ионообменной (IEX) и нормально-фазовой хроматографии (NP). В отличие от хроматографии RP, NP и IEX, в которых гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие и ионное взаимодействие, соответственно, являются доминирующими режимом взаимодействия, в хроматографии со смешанным режимом можно применять комбинацию двух или большего количества данных режимов взаимодействия. Среда для хроматографии со смешанным режимом может обеспечивать уникальную селективность, которая не может быть воспроизведена посредством хроматографии с одним режимом. Хроматография со смешанным режимом также может обеспечивать потенциальную экономию затрат, более длительный срок службы колонки и гибкость в эксплуатации по сравнению со способами на основе аффинности. В некоторых типовых вариантах осуществления среда для хроматографии со смешанным режимом может состоять из лигандов смешанного типа, связанных с органической или неорганической подложкой, иногда обозначаемой как основная матрица, непосредственно или через спейсер. Подложка может быть в форме частиц, таких как по существу сферические частицы, монолит, фильтр, мембрана, поверхность, капилляры и т. д. В некоторых типовых вариантах осуществления подложка может быть получена из природного полимера, такого как сшитый углеводный материал, такой как агароза, агар, целлюлоза, декстран, хитозан, конжак, каррагинан, геллан, альгинат и т. д. Для получения высокой адсорбционной способности носитель может быть пористым, и тогда лиганды связывают с внешними поверхностями, а также с поверхностями пор. Такие нативные полимерные носители могут быть приготовлены стандартными методами, такими как обратное гелеобразование суспензии (см. публикацию Stellan Hjertén, The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles, 79 BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - BIOPHYSICS INCLUDING PHOTOSYNTHESIS 393-398 (1964), включенную в данный документ посредством ссылки). В альтернативном варианте носитель может быть изготовлен из синтетического полимера, такого как сшитые синтетические полимеры, например, стирол или производные стирола, дивинилбензол, акриламиды, акрилатные эфиры, метакрилатные эфиры, виниловые эфиры, виниламиды и т. д. Такие синтетические полимеры могут быть получены стандартными методами, см., например, публикацию Eduardo Vivaldo-Lima et al., An Updated Review on Suspension Polymerization, 36 INDUSTRIAL & ENGINEERING CHEMISTRY RESEARCH 939-965 (1997). Подложки из пористого нативного или синтетического полимера также доступны из коммерческих источников, таких как Amersham Biosciences, Упсала, Швеция.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина может включать обогащение белками клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии.

В контексте данного документа термин «аффинная хроматография» может включать разделения, включающие любой способ, посредством которого два вещества

разделяются на основании их аффинности к хроматографическому материалу. Неограничивающие примеры подложки для аффинной хроматографии включают, помимо прочего, смолу с белком А, смолу с белком G, аффинные подложки, содержащие антиген, против которого была разработана связывающая молекула, и аффинные подложки, содержащие Fc-связывающий белок. Смола для аффинной хроматографии может быть получена путем иммобилизации белка А, белка G, антигена, против которого была разработана связывающая молекула, или Fc-связывающего белка на смоле, такой как агароза или сефароза. Существует несколько коммерческих источников смолы с белком А. Неограничивающие примеры смолы с белком А включают MabSelect SuRe™, MabSelect SuRe LX, MabSelect, MabSelect Xtra, rProtein A Sepharose от компании GE Healthcare, и ProSep HC, ProSep Ultra, и ProSep Ultra Plus от компании EMD Millipore.

В одном аспекте аффинный хроматографический материал может быть уравновешен подходящим буфером перед загрузкой образца. После этого уравнивания матрица образца может быть загружена в колонку. В одном аспекте после загрузки материала для аффинной хроматографии, материал для аффинной хроматографии можно промыть один или несколько раз с применением соответствующего промывочного буфера. В некоторых конкретных аспектах можно собирать проточную жидкость от промывки. В некоторых конкретных аспектах проточную жидкость можно дополнительно обработать. Необязательно, перед элюированием колонки могут быть осуществлены другие промывки, включая промывки с применением различных буферов. Проточную жидкость от промывок можно собрать и подвергнуть дальнейшей обработке. Материал для аффинной хроматографии также можно элюировать с применением соответствующего элюирующего буфера. Элюат можно контролировать с помощью методик, хорошо известных специалистам в данной области техники. Например, можно отслеживать поглощение при OD280. Затем элюированная(ые) фракция(и), представляющая интерес, может быть подготовлена для последующей обработки.

В одном аспекте раствор космотропной соли может быть добавлен в матрицу образца, содержащую представляющий интерес белок, перед приведением в контакт со смолой для аффинной хроматографии. Раствор космотропной соли содержит по меньшей мере одну космотропную соль. Примеры пригодных космотропных солей включают, помимо прочего, сульфат аммония, сульфат натрия, цитрат натрия, сульфат калия, фосфат калия, фосфат натрия и их комбинацию. В одном аспекте космотропная соль представляет собой сульфат аммония; в другом аспекте космотропная соль представляет собой сульфат натрия; и в другом аспекте космотропная соль представляет собой цитрат натрия. Космотропная соль присутствует в растворе космотропной соли в концентрации от около 0,3 М до около 1,1 М. В одном варианте осуществления космотропная соль присутствует в растворе космотропной соли в концентрации около 0,5 М.

В некоторых типовых вариантах осуществления этап обогащения может дополнительно включать обработку образца, полученного из хроматографической подложки.

[1] В некоторых типовых вариантах осуществления указанная обработка может включать добавление к образцу гидролизующего агента для получения пептидов. В данном контексте термин «гидролизующий агент» относится к любому одному или комбинации большого числа различных агентов, которые могут осуществлять расщепление белка. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять ферментативное расщепление, включают трипсин, эндопротеиназу Arg-C, эндопротеиназу Asp-N, эндопротеиназу Glu-C, протеазу внешней мембраны T (OmpT), разрушающий иммуноглобулин фермент *Streptococcus pyogenes* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназу и протеазу из *Aspergillus Saitoi*. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают применение высокой температуры, микроволнового излучения, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения, растворителей (неограничивающими примерами являются этанол и ацетонитрил), расщепление иммобилизованным ферментом (IMER), ферментов с иммобилизованными магнитными частицами и встроенных иммобилизованных ферментов. Недавний обзор, в котором обсуждаются доступные способы для расщепления белка, см. в публикации Switazar et al., “Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments” (Linda Switazar, Martin Giera & Wilfried M. A. Niessen, Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments, 12 JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH 1067-1077 (2013)). Один или комбинация гидролизующих агентов может расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде специфическим для последовательности образом, создавая прогнозируемую коллекцию более коротких пептидов.

[2] Соотношение гидролизующего агента к белку и время, необходимое для расщепления, могут быть соответствующим образом выбраны для получения оптимального расщепления белка. Когда соотношение фермента к субстрату недопустимо большое, это может вызвать неспецифическое расщепление (потенциальное расщепление всех белков/пептидов на отдельные аминокислоты), тем самым ограничивая способность идентифицировать белки, а также уменьшая охват последовательности. С другой стороны, при низком соотношении E/S потребуются длительное расщепление и, следовательно, длительного времени подготовки образца. Соотношение фермента и субстрата может составлять от около 1:0,5 до около 1:500.

[3] В данном контексте термин «расщепление» относится к гидролизу одной или большего количества пептидных связей белка. Существует несколько подходов к проведению расщепления белка в образце с помощью пригодного гидролизующего агента, например, ферментативное расщепление или неферментативное расщепление.

[4] Один из широко распространенных способов расщепления белков в образце предполагает применение протеазы. Существует множество протеаз, и каждая из них имеет свои особенности в плане специфичности, эффективности и оптимальных условий расщепления. Протеазы относятся как к эндопептидазам, так и к экзопептидазам, которые классифицируются на основе способности протеазы расщеплять неконцевые или

концевые аминокислоты в пептиде. В альтернативном варианте, протеазы также относятся к шести различным классам: аспарагиновая, глутаминовая и металлопротеаза, цистеиновая, сериновая и треониновая протеазы, которые классифицируются на основе механизма катализа. Термины «протеаза» и «пептидаза» применяются взаимозаменяемо для обозначения ферментов которые гидролизуют пептидные связи.

[5] Помимо приведения белка клетки-хозяина в контакт с гидролизующим агентом, указанный способ может необязательно включать этапы восстановления белка клетки-хозяина, алкилирования белка клетки-хозяина, буферизации белка клетки-хозяина и/или обессоливания матрицы образца. Эти этапы могут быть выполнены любым пригодным способом, как это необходимо.

[6] В некоторых типовых вариантах осуществления обработка может включать добавление к образцу агента, восстанавливающего белок. В данном контексте термин «агент, восстанавливающий белок» относится к агенту, применяемому для восстановления дисульфидных мостиков в белке. Неограничивающими примерами агентов, восстанавливающих белок, применяемых для восстановления белка, являются дитиотреитол (DTT), β -меркаптоэтанол, реактив Элмана, хлористоводородный гидроксилламин, цианоборгидрид натрия, трис(2-карбоксиэтил)гидрохлорид фосфина (TCSE-HCl) или их комбинации.

[7] В некоторых типовых вариантах осуществления обработка может включать добавление к образцу агента, алкилирующего белок. В данном контексте термин «агент, алкилирующий белок» относится к агенту, применяемому для алкилирования определенных свободных аминокислотных остатков в белке. Неограничивающими примерами агентов, алкилирующих белок, являются йодацетамид (IOA), хлорацетамид (CAA), акриламид (AA), N-этилмалеимид (NEM), метилметантиосульфат (MMTS) и 4-винилпиридин или их комбинации.

В некоторых типовых вариантах осуществления обработка может включать добавление одного или большего количества агентов из группы, состоящей из алкилирующего агента, восстанавливающего агента, гидролизующего агента или их комбинации. Добавление этих агентов к образцу может варьироваться. Добавление может осуществляться путем добавления образца к агентам или путем добавления агентов к образцам.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина может включать обогащение белками клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с хроматографической подложкой и выполнение этапа фракционирования. В данном контексте термин «фракционирование» может включать процесс разделения различных пептидов, полученных в результате расщепления белков клетки-хозяина, присутствующих в матрице образца. Указанный процесс может включать разделение пептидов с помощью пригодной(ых) методики (методик) фракционирования пептидов, которая может фракционировать пептиды на основе их различных общих свойств, таких как pI пептидов, гидрофобность, способность

связывать металлы, содержание открытых тиоловых групп, размер, заряд, форма, растворимость, стабильность и скорость седиментации, способность связываться с различными ионными группами и аффинность к субстратам в качестве основы для выделения пептида(ов) из сложных матриц биологических образцов. Пептиды также можно разделить на основе их клеточного расположения, что позволяет извлекать цитоплазматические, ядерные и мембранные белки.

В некоторых типовых вариантах осуществления фракционирование может представлять собой фракционирование по размеру. В одном аспекте фракционирование по размеру можно проводить с помощью гель-электрофореза. Подробную информацию о гель-электрофорезе можно найти в публикации Zaifang Zhu, Joann Lu & Shaorong Liu, Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review, 709 ANALYTICA CHIMICA ACTA 21-31 (2012), которая включена в данное описание посредством ссылки. Дополнительную информацию о принципах и основах можно найти в публикации SAMEH MAGDELDIN, GEL ELECTROPHORESIS: PRINCIPLES AND BASICS (2012), которая включена в данное описание посредством ссылки.

В одном аспекте фракционирование по размеру можно проводить с помощью диализа. Диализ можно осуществлять с применением молекулярного отсекающего мембранного фильтра или ряда мембранных фильтров. Диализ также можно осуществлять с применением диализных кассет. Пример одного из таких способов диализа может включать применение диализных кассет Slide-A-Lyzer™. Кассетная конструкция помогает максимизировать соотношение площади поверхности к объему образца и обеспечивает превосходное извлечение образца.

В одном аспекте фракционирование по размеру можно проводить с помощью капиллярного электрофореза. Последние тенденции и достижения в области капиллярного электрофореза можно найти в публикациях Robert Voeten et al., Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances, 90 ANALYTICAL CHEMISTRY 1464-1481 (2018) и María Ramos-Payán et al., Recent trends in capillary electrophoresis for complex samples analysis: A review, 39 ELECTROPHORESIS 111-125 (2017), которые включены в данный документ посредством ссылки. Дополнительную информацию о принципах и основах можно найти в публикации Harry Whatley, Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis, CLINICAL AND FORENSIC APPLICATIONS OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS 21-58, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В одном аспекте фракционирование по размеру можно проводить с помощью эксклюзионной хроматографии. Термин «эксклюзионная хроматография», или «SEC», или «гель-фильтрация» означает метод жидкостной колоночной хроматографии, с помощью которого можно сортировать молекулы в соответствии с их размером в растворе. В данном контексте термины «смола SEC для хроматографии» или «среда SEC для хроматографии» применяются взаимозаменяемо и могут включать любой вид твердой фазы, применяемой в SEC, которая отделяет примесь от необходимого продукта (например, гомодимерный контаминант для продукта на основе биспецифического

антитела). Объем смолы, длина и диаметр применяемой колонки, а также динамическая емкость и скорость потока могут зависеть от нескольких параметров, таких как объем жидкости, подлежащей обработке, концентрация белка в жидкости, подлежащей обработке по способу данного изобретения, и т.д. Определение этих параметров для каждого этапа находится в пределах компетенции обычного специалиста в данной области техники. Краткий практический обзор эксклюзионной хроматографии можно найти в публикациях Richard R. Burgess, A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting, 150 PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION 81-85 (2018) и Gloria Brusotti et al., Advances on Size Exclusion Chromatography and Applications on the Analysis of Protein Biopharmaceuticals and Protein Aggregates: A Mini Review, 81 CHROMATOGRAPHIA 3-23 (2017), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки. Дополнительную информацию о принципах и основах SEC можно найти в публикации Paula Hong, Stephan Koza & Edouard S. P. Bouvier, A Review Size-Exclusion Chromatography For The Analysis Of Protein Biotherapeutics And Their Aggregates, 35 JOURNAL OF LIQUID CHROMATOGRAPHY & RELATED TECHNOLOGIES 2923-2950 (2012), которая включена в данный документ посредством ссылки. Более новые методы эксклюзионной хроматографии также могут применяться в способах, описанных в публикации Singh et al., New Automated Systems for Size-fractionation of Protein Samples, 24 JOURNAL OF BIOMOLECULAR TECHNOLOGIES S60-S61 (2013), которая включена в данный документ посредством ссылки.

В одном аспекте фракционирование по размеру может быть выполнено путем фракционирования в потоке при наличии поля. Фракционирование в потоке при наличии поля (FFF) представляет собой класс методов элюирования с "мягким влиянием", применяемых в основном для разделения гетерогенных смесей супрамолекул, белков и биочастиц (диаметром <100 мкм) в ламинарных микрожидкостных потоках. Обзор FFF представлен в статье Messaud et al. (Fathi A. Messaud et al., An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers, 34 PROGRESS IN POLYMER SCIENCE 351-368 (2009)), которая включена в данный документ посредством ссылки. Дополнительные методики для FFF можно найти в публикациях T. Kowalkowski et al., Field-Flow Fractionation: Theory, Techniques, Applications and the Challenges, 36 CRITICAL REVIEWS IN ANALYTICAL CHEMISTRY 129-135 (2006) и Barbara Roda et al., Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends, 635 ANALYTICA CHIMICA ACTA 132-143 (2009), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

В некоторых типовых вариантах осуществления фракционирование может представлять собой фракционирование на основе гидрофобности. В одном аспекте фракционирование по размеру можно проводить с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Обращенно-фазовая хроматография является наиболее широко применяемым хроматографическим режимом, позволяющим разделять белки на основе их гидрофобности. Разделение основано на коэффициенте распределения аналита между

полярной подвижной фазой и гидрофобной (неполярной) стационарной фазой. В случае пептидов более полярные пептиды элюируются первыми, в то время как менее полярные пептиды более сильно взаимодействуют с гидрофобными группами, которые образуют «жидкоподобный» слой вокруг твердой подложки из диоксида кремния. RPLC широко применяется для разделения пептидов из-за простоты использования с градиентным элюированием, совместимости с водными образцами и универсальности механизма удерживания, позволяющего изменять разделение, вызванное изменением pH, органическим модификатором или добавками. В одном аспекте фракционирование по размеру можно проводить с помощью хроматографии с градиентом pH.

В некоторых типовых вариантах осуществления обращенно-фазовая хроматография может включать разделение с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии при низком pH с применением нано-LC. В одном аспекте обращенно-фазовая хроматография может включать разделение с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии при высоком pH. В конкретном аспекте обращенно-фазовая хроматография может включать разделение с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии при высоком pH, ортогональной к обращенно-фазовой жидкостной хроматографии при низком pH. Обзор одного такого двумерного разделения с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии при высоком и низком pH для нисходящей протеомики можно найти в публикации Zhe Wang et al., Two-dimensional separation using high-pH and low-pH reversed phase liquid chromatography for top-down proteomics, 427 INTERNATIONAL JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY 43-51 (2018).

В некоторых типовых вариантах осуществления фракционирование может представлять собой фракционирование на основе заряда. В другом аспекте фракционирование на основе заряда можно проводить с помощью ионообменной хроматографии. В конкретном аспекте ионообменная хроматография может представлять собой катионообменную хроматографию. В другом аспекте ионообменная хроматография может представлять собой анионообменную хроматографию.

В некоторых типовых вариантах осуществления фракционирование может представлять собой фракционирование на основе pI. В одном аспекте фракционирование по заряду можно проводить с помощью ионообменной хроматографии. В конкретном аспекте ионообменная хроматография может представлять собой катионообменную хроматографию. В другом аспекте ионообменная хроматография может представлять собой анионообменную хроматографию. В одном аспекте фракционирование по заряду можно проводить с помощью изоэлектрического фокусирования. Изоэлектрическое фокусирование (IEF) может обеспечить разделение белков, при котором белки могут перемещаться в соответствии со своим зарядом под действием электрического поля в присутствии градиента pH до тех пор, пока суммарный заряд молекулы не станет равным нулю (например, изоэлектрическая точка, pI). Разделение можно рассматривать по составу аминокислот и открытых заряженных остатков, которые проявляют себя как слабые кислоты и основания. Миграция белков будет следовать основным принципам

электрофореза; однако подвижность будет изменяться в присутствии градиента pH за счет замедления миграции при значениях, близких к значению pI. Обзор IEF представлен в статье Pergande and Cologna Melissa Pergande & Stephanie Cologna, *Isoelectric Point Separations of Peptides and Proteins*, 5 *PROTEOMES* 4 (2017), которая включена в данное описание посредством ссылки. Дополнительные методики для IEF можно найти в публикациях Findley Cornell, *Isoelectric Focusing, Blotting and Probing Methods for Detection and Identification of Monoclonal Proteins*, 30 *THE CLINICAL BIOCHEMIST REVIEWS* 123-130 (2009); Tomasz Bączek, *Fractionation of peptides in proteomics with the use of pI-based approach and ZipTip pipette tips*, 34 *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS* 851-860 (2004); C. F. Ivory, *A Brief Review of Alternative Electrofocusing Techniques*, 35 *Separation Science and Technology* 1777-1793 (2000) ; G. B. Smejkal, *Solution phase isoelectric fractionation in the multi-compartment electrolyser: A divide and conquer strategy for the analysis of complex proteomes*, 4 *BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS AND PROTEOMICS* 76-81 (2005), and David Garfin, *Gel Electrophoresis of Proteins*, in *ESSENTIAL CELL BIOLOGY, VOLUME 1, A PRACTICAL APPROACH* 197-268 (2003), которые включены в данное описание посредством ссылки.

Дальнейшие усовершенствования фракционирования на основе pI можно использовать для этапа фракционирования, например, способы, описанные в публикации Subhashini Selvaraju & Ziad El Rassi, *Liquid-phase-based separation systems for depletion, prefractionation and enrichment of proteins in biological fluids and matrices for in-depth proteomics analysis - An update covering the period 2008-2011*, 33 *ELECTROPHORESIS* 74-88 (2011).

В некоторых типовых вариантах осуществления указанный способ характеристики белка клетки-хозяина может включать дополнительную характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

В некоторых типовых вариантах осуществления характеристика может включать идентификацию пептидов, полученных на этапе фракционирования. Идентификация пептидов может быть дополнительно выполнена путем сравнения масс-спектров, полученных в результате фрагментации полипептида, с теоретическими масс-спектрами, полученными в результате расщепления белка *in silico*. Затем делается вывод о белках путем сопоставления пептидных последовательностей с белками.

В данном контексте термин «масс-спектрометр» включает устройство, способное идентифицировать конкретные виды молекул и точное измерение их масс. Подразумевается, что термин включает любой молекулярный детектор, в котором полипептид или пептид могут быть элюированы для детекции и/или характеристики. Масс-спектрометр может включать три основные части: источник ионов, масс-анализатор и детектор. Роль источника ионов заключается в образовании ионов газовой фазы. Атомы, молекулы или кластеры определяемого вещества могут переноситься в газовую фазу и ионизированы одновременно (как в ионизации электрораспылением) или посредством отдельных способов. Выбор источника ионов в основном зависит от применения.

В некоторых типовых вариантах осуществления масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр.

В данном контексте термин «tandемная масс-спектрометрия» включает методику, в которой структурную информацию о молекулах матрицы образца получают посредством применения множества этапов массового отбора и разделения изотопов. Обязательным условием является то, что образцы молекул могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в интактном состоянии и что они могут быть вызваны распадом некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первой стадии массового отбора. Многоэтапную MS/MS, или MSⁿ, можно осуществлять посредством первого выбора и выделения иона прекурсора (MS²), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона (MS³), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (MS⁴), и так до тех пор, пока можно будет получить значимую информацию, или сигнал фрагментного иона будет поддаваться обнаружению. Tandемную MS успешно выполняли с широким разнообразием комбинаций анализатора. Выбор анализатора для конкретного применения может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Две основные категории способов tandemной MS представляют собой «tandем в пространстве» и «tandем во времени», но есть также гибридные способы, в которых анализаторы «tandем во времени» соединены в пространстве или с анализаторами «tandем в пространстве». Масс-спектрометр «tandем в пространстве» включает источник ионов, устройство активации ионов-прекурсоров и по меньшей мере два не захватывающих масс-анализатора. Конкретные функции m/z разделения могут быть спроектированы таким образом, чтобы в одной секции прибора ионы выбирались, диссоциировали в промежуточной области, а ионы продукта затем передавались в другой анализатор для m/z разделения и сбора данных. В масс-спектрометре «tandем во времени» ионы, образующиеся в ионном источнике, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по m/z в одном и том же физическом устройстве.

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

В данном контексте термин «база данных» относится к биоинформатическим инструментам, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров MS-MS по всем возможным последовательностям в базе данных. Неограничивающие примеры таких инструментов представляют собой Mascot

(<http://www.matrixscience.com>), Spectrum Mill (<http://www.chem.agilent.com>), PLGS (<http://www.waters.com>), PEAKS (<http://www.bioinformaticssolutions.com>), Proteinpilot (<http://download.appliedbiosystems.com/proteinpilot>), Phenyx (<http://www.phenyx-ms.com>), Sorcerer (<http://www.sagenresearch.com>), OMSSA (<http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/>), X!Tandem (<http://www.thegpm.org/TANDEM/>), Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), Byonic (<https://www.proteinmetrics.com/products/byonic>), Andromeda (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21254760>) или Sequest (<http://fields.scripps.edu/sequest>).

В некоторых типовых вариантах осуществления масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В других типовых вариантах осуществления масс-спектрометр может быть соединен с с системой наножидкостной хроматографии. В одном аспекте подвижная фаза, применяемая для элюирования белка в системе жидкостной хроматографии, может представлять собой подвижную фазу, которая может быть совместима с масс-спектрометром. В конкретном аспекте подвижная фаза может представлять собой ацетат аммония, бикарбонат аммония или формиат аммония, ацетонитрил, воду, муравьиную кислоту, летучую кислоту или их комбинации.

В некоторых типовых вариантах осуществления указанный способ характеристики белка клетки-хозяина может включать дополнительную характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля. В данном контексте термины «спектрометрия ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля» или «FAIMS», или «спектрометрия дифференциальной подвижности», или «DMS» могут включать методику определения подвижности ионов при атмосферном давлении, которая разделяет ионы газовой фазы по их поведению в сильных и слабых электрических полях. Устройство FAIMS может быть легко сопряжено с ионизацией электрораспылением и реализовано в качестве дополнительного режима разделения между жидкостной хроматографией (LC) и масс-спектрометрией (MS) в протеомных исследованиях. Разделение FAIMS может быть ортогональным как к LC, так и MS, и может использоваться как средство «on-line» фракционирования для улучшения обнаружения пептидов в комплексных образцах. FAIMS может улучшить динамический диапазон и, соответственно, пределы обнаружения ионов, отфильтровывая химический шум. FAIMS также можно применять для удаления интерферирующих видов ионов и выбора состояния заряда пептидов, оптимального для идентификации с помощью тандемной MS. Обзор применения FAIMS для протеомики на основе масс-спектрометрии можно найти в статье, опубликованной Swearingen and Moritz (Kristian E Swearingen & Robert L Moritz, High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry for mass spectrometry-based proteomics, 9 Expert Review of Proteomics 505-517 (2012)), которая включена в данное описание посредством ссылки. Более подробную информацию о FAIMS также можно найти в

нескольких обзорах: Roger Guevremont, High-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry: A new tool for mass spectrometry, 1058 JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A 3-19 (2004); Alexandre A. Shvartsburg et al., Field Asymmetric Waveform Ion Mobility Spectrometry Studies of Proteins: Dipole Alignment in Ion Mobility Spectrometry?, 110 THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B 21966-21980 (2006); Beata M. Kolakowski & Zoltán Mester, Review of applications of high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry (FAIMS) and differential mobility spectrometry (DMS), 132 THE ANALYST 842 (2007), каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки. Общий обзор FAIMS от Kolakowski и Mester, серия теоретических и практических исследований FAIMS от Nazarov и его коллег (Nazarov, Electric field dependence of the ion mobility, 285 INTERNATIONAL JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY 149-156 (2009)); Bradley B. Schneider et al., Planar differential mobility spectrometer as a pre-filter for atmospheric pressure ionization mass spectrometry, 298 INTERNATIONAL JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY 45-54 (2010); Evgeny V. Krylov et al., Selection and generation of waveforms for differential mobility spectrometry, 81 REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS 024101 (2010); Bradley B. Schneider et al., Control of Chemical Effects in the Separation Process of a Differential Mobility Mass Spectrometer System, 16 EUROPEAN JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY 57-71 (2010); Stephen L. Coy et al., Detection of radiation-exposure biomarkers by differential mobility prefiltered mass spectrometry (DMS-MS), 291 INTERNATIONAL JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY 108-117 (2010); Bradley B. Schneider et al., Control of Chemical Effects in the Separation Process of a Differential Mobility Mass Spectrometer System, 16 EUROPEAN JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY 57-71 (2010), а также книга Shvartsburg (ALEXANDRE A. SHVARTSBURG, DIFFERENTIAL ION MOBILITY SPECTROMETRY NONLINEAR ION TRANSPORT AND FUNDAMENTALS OF FAIMS (2009)), все включены в данное описание посредством ссылки.

Любой коммерческий или адаптированный масс-спектрометр и ячейки/системы/устройства FAIMS можно применять для характеристики белка клетки-хозяина. Ячейки FAIMS могут различаться по размеру - это может быть «полноразмерная» ячейка (FS-FAIMS) длиной 65 мм, шириной 20 мм и аналитическим зазором 2 мм; ячейка «четверть» (QS-FAIMS) длиной 15 мм, шириной 5 мм и аналитическим зазором 0,38 мм. Применяемое устройство FAIMS может быть с-FAIMS от компании Ionalytics или p-FAIMS от компании Sionex. Также можно применять миниатюрные системы FAIMS на основе микросхем, например, полученные от компании Owlstone Nanotech Inc.: UltraFAIMS A1 и газоанализатор Lonestar. Оба чипа в каждом устройстве состоят из двух гребенчатых электродов, которые создают змеевидную геометрию на поверхности чипа, при этом каждый ряд представляет собой отдельный плоский канал FAIMS. Для этого способа также можно применять интерфейс FAIMS Pro™ от компании Thermo Scientific.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и

проведения этапа фракционирования.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии с белком А и проведения этапа фракционирования.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с хроматографической подложкой, выполнения этапа фракционирования и характеристики по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с хроматографической подложкой, выполнения этапа фракционирования и характеристики по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью тандемного масс-спектрометра. В одном аспекте тандемный масс-спектрометр может быть «тандемным в пространстве» или «тандемным во времени».

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с хроматографической подложкой, выполнения этапа фракционирования и характеристики по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра, соединенного с системой жидкостной хроматографии. В одном аспекте система жидкостной хроматографии может представлять собой систему наножидкостной хроматографии (nLC).

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с хроматографической подложкой, выполнения этапа фракционирования и характеристики по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS-MS. В одном аспекте газ-носитель, применяемый для FAIMS, может включать летучие химические модификаторы. В конкретном аспекте летучий химический модификатор может представлять собой изопропанол или метиленхлорид.

В одном конкретном типовом варианте осуществления устройство FAIMS можно применять вместе с MS. В другом конкретном типовом варианте осуществления устройство FAIMS можно применять вместе с LC и MS.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с хроматографической подложкой, выполнения этапа фракционирования и характеристики по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью LC-FAIMS-MS.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с хроматографической подложкой и выполнения этапа фракционирования, при этом указанный способ может характеризовать по меньшей мере на около 20% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования. В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 20% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 25% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 30% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 35% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 40% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 45% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 55% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 60% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 65% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 70% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 75% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 80% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 85% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 90% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 95% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 100% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 105% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 110% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 115% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 120% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 125% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 130% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 135% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 140% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 145% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 150% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 155% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 160% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 165% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 170% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 175% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 180% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 185% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 190% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 195% больше белков клетки-хозяина или по меньшей мере на около 200% больше белков клетки-хозяина. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с хроматографической подложкой и выполнения этапа фракционирования, при этом указанный способ может характеризовать

по меньшей мере на около 20% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения. В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 20% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 25% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 30% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 35% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 40% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 45% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 55% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 60% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 65% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 70% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 75% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 80% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 85% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 90% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 95% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 100% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 105% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 110% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 115% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 120% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 125% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 130% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 135% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 140% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 145% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 150% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 155% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 160% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 165% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 170% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 175% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 180% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 185% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 190% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 195% больше белков клетки-хозяина или по меньшей мере на около 200% больше белков клетки-хозяина. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с хроматографической подложкой и выполнения этапа фракционирования, при этом указанный способ может характеризовать по меньшей мере на около 20% -200% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап обогащения, а не этап фракционирования. В одном аспекте способ может быть способен охарактеризовать на около 20-30% больше белков клетки-хозяина, на около 30% - 40% больше белков клетки-хозяина, на около 40% - 50% больше белков

клетки-хозяина, на около 50% - 60% больше белков клетки-хозяина, на около 60%- 70% больше белков клетки-хозяина, на около 70% - 80% больше белков клетки-хозяина, на около 80%- 90% больше белков клетки-хозяина, на около 90% - 100% больше белков клетки-хозяина, на около 100% - 150% больше белков клетки-хозяина или на около 100% - 200% больше белков клетки-хозяина. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в образце может включать этапы обогащения белков клетки-хозяина в образце путем приведения образца в контакт с хроматографической подложкой и выполнения этапа фракционирования, при этом указанный способ может характеризовать по меньшей мере на около 20% -200% больше белков клетки-хозяина, чем способ, включающий этап фракционирования, а не этап обогащения. В одном аспекте способ может быть способен охарактеризовать на около 20-30% больше белков клетки-хозяина, на около 30% - 40% больше белков клетки-хозяина, на около 40% - 50% больше белков клетки-хозяина, на около 50% - 60% больше белков клетки-хозяина, на около 60% - 70% больше белков клетки-хозяина, на около 70% - 80% больше белков клетки-хозяина, на около 80%- 90% больше белков клетки-хозяина, на около 90% - 100% больше белков клетки-хозяина, на около 100% - 150% больше белков клетки-хозяина или на около 100% - 200% больше белков клетки-хозяина. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси и обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с хроматографической подложкой. Хроматографическая подложка может представлять собой подложку для жидкостной хроматографии. Как объяснялось выше, подложка для жидкостной хроматографии может включать обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, хроматографию со смешанным режимом, гидрофобную хроматографию или хроматографию со смешанным режимом.

В данном контексте термины «неденатурирующие условия расщепления» или «нативные условия» могут включать условия, которые не вызывают денатурацию белка. Денатурация белка может относиться к процессу, в котором трехмерная форма молекулы изменяется от его нативного состояния без разрыва пептидных связей. Денатурацию белка можно проводить с применением агента, денатурирующего белок, такого как хаотропные агенты. Хаотропные растворенные вещества повышают энтропию системы посредством препятствования внутримолекулярным взаимодействиям, опосредованным нековалентными силами, такими как водородные связи, ван-дер-ваальсовы силы и гидрофобные эффекты. Неограничивающие примеры неденатурирующих условий включают воду или буферы. Применяемая вода может быть дистиллированной и/или

деионизированной. В некоторых типовых вариантах осуществления растворители могут быть HPLC-класса. Неограничивающие примеры буферов могут включать ацетат аммония, трис-гидрохлорид, бикарбонат аммония, формиат аммония или их комбинации. В одном аспекте концентрация буфера может составлять не более 1 М.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси и обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси и обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии с белком А.

В одном типовом варианте осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси, обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с хроматографической подложкой и сбор проточной жидкости из подложки для аффинной хроматографии.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина в матрице образца может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси, обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с хроматографической подложкой и характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра. В одном аспекте масс-спектрометр может представлять собой tandemный масс-спектрометр. Tandemный масс-спектрометр может быть «tandemным в пространстве» или «tandemным во времени». В одном аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии. В другом аспекте масс-спектрометр может быть соединен с системой наножидкостной хроматографии. В одном аспекте подвижная фаза, применяемая для элюирования белка в системе жидкостной хроматографии, может представлять собой подвижную фазу, которая может быть совместима с масс-спектрометром. В конкретном аспекте подвижная фаза может представлять собой ацетат аммония, бикарбонат аммония или формиат аммония, ацетонитрил, воду, муравьиную кислоту, летучую кислоту или их комбинации. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии. В одном аспекте указанный способ может дополнительно включать применение устройства FAIMS для характеристики.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка

клетки-хозяина в матрице образца может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси, обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с хроматографической подложкой, при этом указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, не предусматривающий приведения смеси в контакт с хроматографической подложкой. В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 75% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 100% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 125% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 150% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 175% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 200% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 225% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 250% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 275% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 300% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 325% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 350% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 375% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 400% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 425% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 450% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 475% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 500% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 525% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 550% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 575% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 600% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 625% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 650% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 675% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 700% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 725% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 750% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 775% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 800% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 825% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 850% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 875% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 900% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 925% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 950% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 975% больше белков клетки-хозяина или по меньшей мере на около 1000% больше белков клетки-хозяина. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии. В одном аспекте указанный способ может дополнительно включать применение устройства FAIMS для характеристики.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина в матрице образца может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси, обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с хроматографической подложкой, при этом указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% - 100% больше белков клетки-хозяина, чем способ, не предусматривающий приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии. В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать на около 50% - 100% больше белков клетки-хозяина, на около 50% - 500% больше белков клетки-хозяина, на около 100% - 500% больше белков клетки-хозяина, на около 100% - 1000% больше белков клетки-хозяина или на около 500% - 1000% больше белков клетки-хозяина. В одном аспекте хроматографическая подложка может представлять собой подложку для аффинной хроматографии. В одном аспекте указанный способ может дополнительно включать применение устройства FAIMS для характеристики.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина в матрице образца может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси, обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина в матрице образца может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси, обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS-MS. В одном аспекте газ-носитель, применяемый для устройства FAIMS, может включать летучие химические модификаторы. В одном аспекте летучий химический модификатор может представлять собой изопропанол. В другом аспекте устройство FAIMS можно применять вместе с MS. В другом конкретном аспекте устройство FAIMS можно применять вместе с LC и MS. В другом конкретном аспекте FAIMS-MS может быть соединена с LC.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина в матрице образца может включать воздействие на матрицу образца, содержащую белки клетки-хозяина, неденатурирующими условиями расщепления с образованием смеси, обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью nLC-FAIMS-MS.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина может включать обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца

путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии с образованием образца, подвергая образец, содержащий белки клетки-хозяина, воздействию неденатурирующих условий расщепления с образованием смеси и характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS, при этом указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 15% больше белков клетки-хозяина, чем способ, не включающий FAIMS. В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 15% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 16% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 17% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 18% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 19% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 20% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 21% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 22% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 23% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 24% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 25% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 26% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 27% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 28% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 29% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 30% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 31% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 32% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 33% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 34% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 35% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 36% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 37% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 38% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 39% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 40% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 41% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 42% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 43% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 44% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 45% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 46% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 47% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 48% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 49% больше белков клетки-хозяина или по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белка клетки-хозяина может включать обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения смеси в контакт с подложкой для аффинной хроматографии с образованием образца, подвергая образец, содержащий белки клетки-хозяина, воздействию неденатурирующих условий расщепления с образованием смеси и характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS,

при этом указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 15% - 60% больше белков клетки-хозяина, чем способ, не включающий FAIMS.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать (а) обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и (b) характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать (а) обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и (b) характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS, при этом указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 30% больше белков клетки-хозяина, чем способ, не включающий этап (b). В одном аспекте указанный способ может быть способен охарактеризовать по меньшей мере на около 30% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 35% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 40% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 45% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 55% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 60% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 65% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 70% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 75% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 80% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 85% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 90% больше белков клетки-хозяина, по меньшей мере на около 95% больше белков клетки-хозяина или по меньшей мере на около 100% больше белков клетки-хозяина.

В некоторых типовых вариантах осуществления способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца может включать (а) обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии и (b) характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью FAIMS, при этом указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 30% - 75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, не включающий этап (b).

Следует понимать, что указанные способы не ограничиваются каким-либо из вышеупомянутых белков, белков клетки-хозяина, хроматографической подложкой, масс-спектрометрией, способом фракционирования, и что указанные способы характеристики белков клетки-хозяина могут быть проведены с помощью любых пригодных средств.

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

В тексте описания цитируются различные публикации, включая патенты, патентные заявки, опубликованные патентные заявки, номера доступа, технические статьи и научные статьи. Каждая из этих процитированных ссылок в полном объеме и во всех целях включена в данный документ посредством ссылки.

Данное изобретение станет более понятным из следующих примеров. Однако их не следует рассматривать как ограничение объема изобретения.

ПРИМЕРЫ

(А) Количество НСР, идентифицированных для препарата, содержащего Ab1.

Материалы. Деионизированную воду получали с помощью встроенной системы очистки воды Milli-Q, установленной с фильтром MilliPak Express 20 (MilliporeSigma, Берлингтон, штат Массачусетс). Ацетат аммония (класс LC/MS), уксусная кислота и бикарбонат аммония (класс LC/MS), модифицированный трипсин для секвенирования, поставляемый с ресуспендирующим буфером от Promega, UltraPure 1M Tris-HCl pH 7,5 от Invitrogen, UltraPure 1M Tris-HCl pH 8 от Invitrogen, трифторуксусная кислота (TFA, класс для секвенирования) от Thermo Scientific, ацетонитрил (класс Optima LC/MS) от Fisher, ледяная уксусная кислота от Sigma-Aldrich, йодацетамид от Sigma-Aldrich, дитиотреитол (DTT) от Sigma-Aldrich, мочевины (сверхчистая) от Alfa Aesar, фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS), pH 8,4 от Thermo Scientific, Смола для очистки антител rProtein A Sepharose Fast Flow от GE Healthcare и ацетат аммония (класс LC/MS) от Sigma-Aldrich. Препарат, анализируемый на НСР, содержал антитело Ab1.

Анализ данных. Поиск пептидов в базе данных выполняли с помощью SEQUEST и MASCOT, встроенных в Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific) по базе данных мышинных белков SwissProt. Параметры поиска были следующие: Допуск 20 ppm для масс ионов-предшественников, допуск 0,5 Да для масс фрагментных ионов, проанализированных с помощью ионной ловушки. При поиске по базе данных был указан трипсин. Окисление метионина (+16 Да) задавали как переменную модификацию. Частота ложных открытий (FDR) определялась с помощью стратегии «мишень-приманка» и была установлена на 1% для идентификации пептидов и 5% для идентификации белков с минимумом 1 уникальным пептидом, обнаруженным на белок (Alexander S. Hebert et al., The One Hour Yeast Proteome, 13 MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS 339-347 (2013)).

Пример 1. НСР в собранной клеточной культуральной жидкости

Собранную культуральную жидкость клеток сушили и восстанавливали в 8 М мочевины, 100 мМ Трис-HCl. Образцы восстанавливали с применением 10 мМ дитиотреитола и инкубировали в течение 30 мин при 50 °C. Восстановленные образцы затем алкилировали 15 мМ йодацетамидом в течение 1 часа в темноте. После алкилирования образцы заменяли буфером на 100 мМ бикарбоната аммония с фильтрами с отсечением по молекулярной массе, и расщепляли трипсином (мас./мас. соотношение фермент:субстрат 1:20) при 37°C в темноте в течение ночи. Затем расщепление останавливали добавлением трифторуксусной кислоты (TFA). Затем полученные триптические пептиды разделяли обращенно-фазовой жидкостной хроматографией с

последующим «on-line»масс-спектрометрическим анализом. Разделение проводили с применением Thermo Scientific Easy-nLC 1200, сначала концентрируя и обессоливая триптические пептиды на колонке-ловушке Thermo Scientific Acclaim PepMapTM 100 (C18, внутренний диаметр 75 мкм, длина слоя 2 см, размер частиц 3 мкм, размер пор 100Å) и затем разделяя их на колонке New Objective PicoFrit (OD 360 мкм, ID75 мкм, ID наконечника 10 мкм, длина слоя 25 см), заполненной неподвижной фазой Acquity BEH (C18, размер частиц 1,7 мкм, размер пор 130Å), с применением воды, содержащей 0,1% муравьиной кислоты (подвижная фаза А) и 80% ацетонитрила/20% воды, содержащей 0,1% муравьиной кислоты (подвижная фаза В). Пептиды разделяли с применением профиля градиента, поддерживаемого при 6% подвижной фазы В в течение первых 10 минут, затем повышали от 6% до 50% подвижной фазы В в течение следующих 120 минут. Эксперименты MS и MS/MS проводили на масс-спектрометре Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos Tribrid с высокоэнергетической столкновительной диссоциацией (HCD), используемой для фрагментации пептидов в экспериментах MS/MS (Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, штат Калифорния, США)).

Количество НСР, идентифицированных в HCCF без какой-либо обработки, составило 1279 (см. Фиг. 1). Кроме того, общее количество уникальных пептидов, идентифицированных в HCCF без какой-либо обработки, составило 5675.

Пример 2. НСР, охарактеризованные с применением деплетирования белка А

2.1 Хроматография с белком А

Образцы белка высушивали и ресуспендировали в DPBS. rБелок А сефарозу помещали в колонки и уравнивали 5 объемами колонки DPBS, pH 8,4. Образец белка пипеткой наносили на каждую колонку и инкубировали в течение 4 мин при комнатной температуре. Проточную жидкость НСР собирали и сохраняли. Каждую колонку промывали 3 объемами колонки DPBS, pH 8,4, и элюат НСР объединяли с проточной жидкостью. Собранные элюаты НСР заменяли буфером на 50 мМ ацетат аммония.

2.2 Анализ НСР

Элюат НСР обрабатывали перед анализом, как продемонстрировано в примере 1.

Количество НСР, идентифицированных с помощью хроматографии с белком А, составило 1906 (см. Фиг. 1). Кроме того, общее количество уникальных пептидов, идентифицированных в HCCF с помощью хроматографии с белком А, составило 9245.

Пример 3. НСР, охарактеризованные с помощью способа фракционирования

На этом этапе применяли набор PierceTM High pH для обращенно-фазового фракционирования пептидов (PierceTM High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit) (см. Фиг. 2).

3.1 Кондиционирование спин-колонок

Защитный белый наконечник с нижней части колонки удаляли и отбраковывали, а колонку помещали в пробирку для образцов объемом 2,0 мл. Пробирку центрифугировали при 5000×g в течение 2 минут для удаления раствора и упаковки смоляного материала, а жидкость сливали. Верхнюю закручивающуюся крышку удаляли, в колонку загружали

300 мкл ACN (Fisher), крышку заменяли, спин-колонку помещали обратно в пробирку для образцов объемом 2,0 мл и центрифугировали при $5000 \times g$ в течение 2 минут. ACN сливали и начинали этап промывки. Затем спин-колонку дважды промывали 0,1% раствором TFA (Thermo Scientific), как описано выше для промывки ACN.

3.2 Фракционирование НССФ

Элюирующие растворы готовили, как приведено в Таблице 1. 100 мкг белка из собранной жидкости для культивирования клеток добавляли в 300 мкл 0,1% раствора TFA. Спин-колонку помещали в новую пробирку для образца объемом 2,0 мл, и раствор образца загружали в колонку. После замены верхней крышки пробирку с образцом центрифугировали при $3000 \times g$ в течение 2 минут. Собирали фракцию «проточной жидкости». Затем колонку помещали в новую пробирку для образцов объемом 2,0 мл, добавляли [300] мкл воды в колонку и снова центрифугировали для сбора фракции «проточной жидкости». Затем колонку помещали в новую пробирку для образцов объемом 2,0 мл, добавляли [300] мкл соответствующего элюирующего раствора и центрифугировали при $3000 \times g$ в течение 2 минут для сбора фракции. Этот этап повторяли для оставшихся фракций ступенчатого градиента с применением соответствующих растворов для элюирования из Таблицы 1 в новых пробирках для образцов объемом 2,0 мл. Жидкое содержимое каждой пробирки для образцов выпаривали досуха, применяя вакуумное центрифугирование (например, концентратор SpeedVac). Сухие образцы повторно суспендировали в соответствующем объеме 0,1% муравьиной кислоты (FA) перед анализом LC-MS.

3.3 Анализ НСР

Каждую из фракций обрабатывали перед анализом, как продемонстрировано в Примере 1. Количество НСР, идентифицированных с помощью фракционирования, составило 2023 (см. Фиг. 3). Кроме того, общее количество уникальных пептидов, идентифицированных в НССФ с помощью фракционирования, составило 11750.

Таблица 1.

Фракция №	Ацетонитрил (%)	Ацетонитрил (мкл)	Триэтиламин (0,1%) (мкл)
1	5,0	50	950
2	7,5	75	926
3	10,0	100	900
4	12,5	125	875
5	15,0	150	850
6	17,5	175	825
7	20,0	200	800
8	50,0	500	500

Пример 4. НСР, охарактеризованные с помощью деплетирования белка А и способа фракционирования.

4.1 Хроматография с белком А

Хроматографию белка А проводили с помощью способа, описанного в Примере 2.

Белки в проточной жидкости восстанавливали 10 мМ дитиотреитола и инкубировали в течение 30 мин при 50 °С. Восстановленные образцы затем алкилировали 15 мМ иодацетамидом в течение 1 часа в темноте. После алкилирования образцы заменяли буфером на 100 мМ бикарбоната аммония с фильтрами с отсечением по молекулярной массе, и расщепляли трипсином (мас./мас. соотношение фермент:субстрат 1:20) при 37°С в темноте в течение ночи. Затем расщепление останавливали добавлением трифторуксусной кислоты (TFA). Затем полученные триптические пептиды подвергали этапу фракционирования.

4.2 Этап фракционирования

Полученные триптические пептиды фракционировали, как описано в Примере 3.

4.3 Анализ НСР

Каждый из фракционированных пептидов, полученных на этапе 4.2, подвергали разделению с помощью обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с последующим «on-line» масс-спектрометрическим анализом. Разделение проводили с применением Thermo Scientific Easy-nLC 1200, сначала концентрируя и обессоливая триптические пептиды на колонке-ловушке Thermo Scientific Acclaim PepMap™ 100 (C18, внутренний диаметр 75 мкм, длина слоя 2 см, размер частиц 3 мкм, размер пор 100Å) и затем разделяя их на колонке New Objective PicoFrit (OD 360 мкм, ID 75 мкм, ID наконечника 10 мкм, длина слоя 25 см), заполненной неподвижной фазой Acquity BEH (C18, размер частиц 1,7 мкм, размер пор 130Å), с применением воды, содержащей 0,1% муравьиной кислоты (подвижная фаза А) и 80% ацетонитрила/20% воды, содержащей 0,1% муравьиной кислоты (подвижная фаза В). Пептиды разделяли с применением профиля градиента, поддерживаемого при 6% подвижной фазы В в течение первых 10 минут, затем повышали от 6% до 50% подвижной фазы В в течение следующих 120 минут. Эксперименты MS и MS/MS проводили на масс-спектрометре Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos Tribrid с высокоэнергетической столкновительной диссоциацией (HCD), используемой для фрагментации пептидов в экспериментах MS/MS (Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, штат Калифорния, США)).

Количество НСР, идентифицированных с помощью указанного способа (хроматография с белком А и этап фракционирования), составило 3195 (см. Фиг. 4). Кроме того, общее количество уникальных пептидов, идентифицированных в НССФ с помощью модифицированного способа (хроматография с белком А и этап фракционирования), составило 23133.

Пример 5. НСР, охарактеризованные с помощью нормального расщепления

5.1 Подготовка образцов

Ab1 расщепляли добавлением к смеси трипсина до концентрации субстрата 1:20 в

100 мМ бикарбоната аммония, pH 7,4.

5.2 Анализ НСР

Полученные продукты расщепления анализировали на предмет НСР с помощью способа, описанного в Примере 1. Количество НСР, идентифицированных с помощью указанного способа, составило 7 (см. Фиг. 5), а общее количество идентифицированных уникальных пептидов составило 9.

Пример 6. НСР, охарактеризованные с помощью нативного расщепления

6.1 Подготовка образцов

Ab1 обрабатывали путем высушивания образцов и ресуспендирования в 25 мМ трис-HCl-буфере, pH 8. Образцы расщепляли трипсином (соотношение фермент:субстрат 1:400 мас./мас.) при 37 °C в течение ночи с конечным pH ~7,4. Образцы восстанавливали с применением 3 мМ дитиотреитола и инкубировали в течение 10 мин при 90 °C. Образцы подкисляли до ~0,2% муравьиной кислоты и центрифугировали при 15000 x g в течение 2 мин. Супернатант применяли для анализа LC/MS.

6.2 Анализ НСР

Полученные продукты расщепления анализировали на предмет НСР с помощью способа, описанного в Примере 1. Количество НСР, идентифицированных с помощью указанного способа, составило 20 (см. Фиг. 5), а общее количество идентифицированных уникальных пептидов составило 37.

Пример 7. НСР, охарактеризованные с применением деплетирования белка А с последующим нативным расщеплением

Продукты расщепления из эксперимента 6.1 генерировали после хроматографии с деплетированием белка А с помощью способа, описанного в Примере 2. Проточную жидкость собирали и анализировали, как описано выше. Количество НСР, идентифицированных с помощью указанного способа (нативное расщепление и хроматография с белком А), составило 132 (см. Фиг. 6), а общее количество идентифицированных уникальных пептидов составило 424.

Пример 8. НСР, охарактеризованные с применением деплетирования белка А

8.1 Хроматография с белком А

Образцы белка высушивали и ресуспендировали в DPBS. rБелок А сефарозу помещали в колонки и уравнивали 5 объемами колонки DPBS, pH 8,4. Образец белка пипеткой наносили на каждую колонку и инкубировали в течение 4 мин при комнатной температуре. Проточную жидкость НСР собирали и сохраняли. Каждую колонку промывали 3 объемами колонки DPBS, pH 8,4, и элюат НСР объединяли с проточной жидкостью. Собранные элюаты НСР заменяли буфером на 50 мМ ацетат аммония.

8.2 Анализ НСР

Элюат НСР сушили и восстанавливали в 8 М мочеvine, 100 мМ Трис-HCl. Образцы восстанавливали с применением 10 мМ дитиотреитола и инкубировали в течение 30 мин при 50 °C. Восстановленные образцы затем алкилировали 15 мМ иодацетамидом в течение 1 часа в темноте. После алкилирования образцы заменяли буфером на 100 мМ

бикарбоната аммония с фильтрами с отсечением по молекулярной массе, и расщепляли трипсином (мас./мас. соотношение фермент:субстрат 1:20) при 37°C в темноте в течение ночи. Затем расщепление останавливали добавлением трифторуксусной кислоты (TFA). Затем полученные триптические пептиды разделяли обращенно-фазовой жидкостной хроматографией с последующим «on-line» масс-спектрометрическим анализом. Разделение проводили с применением Thermo Scientific Easy-nLC 1200, сначала концентрируя и обессоливая триптические пептиды на колонке-ловушке Thermo Scientific Acclaim PepMapTM 100 (C18, внутренний диаметр 75 мкм, длина слоя 2 см, размер частиц 3 мкм, размер пор 100Å) и затем разделяя их на колонке New Objective PicoFrit (OD 360 мкм, ID 75 мкм, ID наконечника 10 мкм, длина слоя 25 см), заполненной неподвижной фазой Acquity BEH (C18, размер частиц 1,7 мкм, размер пор 130Å), с применением воды, содержащей 0,1% муравьиной кислоты (подвижная фаза А) и 80% ацетонитрила/20% воды, содержащей 0,1% муравьиной кислоты (подвижная фаза В). Пептиды разделяли с применением профиля градиента, поддерживаемого при 6% подвижной фазы В в течение первых 10 минут, затем повышали от 6% до 50% подвижной фазы В в течение следующих 120 минут. Эксперименты MS и MS/MS проводили на масс-спектрометре Thermo Scientific Orbitrap Fusion Lumos Tribrid с высокоэнергетической столкновительной диссоциацией (HCD), используемой для фрагментации пептидов в экспериментах MS/MS (Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Fisher Scientific, Сан-Хосе, штат Калифорния, США)).

Количество HCP Ab1 в HCCF, идентифицированных с помощью хроматографии с белком А, составило 1759 (см. Фиг. 7), а общее количество идентифицированных уникальных пептидов составило 7086.

Пример 9. HCP, охарактеризованные с помощью деплетирования белка А и устройства FAIMS

Белки в проточной жидкости после хроматографии с белком А, выполненной в Примере 8, расщепляли до пептидов и анализировали с помощью системы, как описано ниже.

Для эксперимента с поддержкой FAIMS, настройки были идентичны описанным в примере выше, за исключением того, что устройство FAIMS помещали между источником наноэлектроспрея и масс-спектрометром. Разделение FAIMS выполняли со следующими настройками: температура внутреннего электрода=100 °C (если не указано иное), температура внешнего электрода=100 °C, поток газа-носителя FAIMS=4,6 л/мин, асимметричная форма волны с DV=-5000 В, входное напряжение пластины=250 В, время установления CV=25 мс. В качестве газа-носителя FAIMS применяется только N₂, а зазор для разделения ионов составляет 1,5 мм. Отмеченные CV применялись к электродам FAIMS. Для экспериментов с внешним поэтапным или одиночным CV, выбранный CV применялся ко всем сканированиям на протяжении всего анализа. Для экспериментов с внутренним поэтапным CV, каждый из выбранных CV применялся к последовательным обзорным сканированиям и циклам MS/MS (1 с); MS/MS CV всегда сочетался с

соответствующим CV из соответствующего обзорного сканирования.

Количество НСР Ab1 в HCCF, идентифицированных с помощью хроматографии с белком А в сочетании с применением устройства FAIMS, составило 2641 (см. Фиг. 7), а общее количество уникальных пептидов составило 10606.

Пример 10. НСР, охарактеризованные с применением нативного расщепления и хроматографии с белком А

10.1 Хроматография с белком А

Образец Ab1 очищали с помощью хроматографии с деплетированием белка А, применяя способ, описанный в Примере 2. Проточную жидкость собирали и расщепляли, как описано выше.

10.2 Нативное расщепление

Ab1 обрабатывали путем высушивания образцов и ресуспендирования в 25 мМ трис-НСl-буфере, pH 8. Образцы расщепляли трипсином (соотношение фермент:субстрат 1:400 мас./мас.) при 37 °C в течение ночи с конечным pH ~7,4. Образцы восстанавливали с применением 3 мМ дитиотреитола и инкубировали в течение 10 мин при 90 °C. Образцы подкисляли до ~0,2% муравьиной кислоты и центрифугировали при 15000 x g в течение 2 мин. Супернатант применяли для анализа LC/MS.

Количество НСР в mAb1, идентифицированных с помощью указанного способа (нативное расщепление и хроматография с белком А), составило 146 (см. Фиг. 8), а общее количество идентифицированных уникальных пептидов составило 363.

Пример 11. НСР, охарактеризованные с помощью нативного расщепления, хроматографии с белком А и FAIMS

Супернатант из Примера 10 также анализировали с помощью устройства FAIMS, как описано в Примере 9.

Количество НСР, идентифицированных с помощью способа с применением условий нативного расщепления в сочетании с применением устройства FAIMS, составило 214 (см. Фиг. 8), а общее количество идентифицированных уникальных пептидов составило 505.

(В) Количество НСР, идентифицированных для препарата, содержащего Ab1.

Химические соединения. Ледяная уксусная кислота, мочевиная, йодацетамид (IAM) и дитиотреитол (DTT) были приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури). Трифторуксусная кислота (TFA), муравьиная кислота (FA), ацетонитрил и фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS 10x, без кальция, без магния) были получены от компании Thermo Fisher Scientific (Рокфорд, штат Иллинойс), а гранулы гБелка А сефарозы Fast Flow были приобретены у компании GE Healthcare (Уппсала, Швеция). Трипсин, модифицированный для секвенирования, с буфером для ресуспендирования был приобретен у компании Promega (Мэдисон, штат Висконсин), трис-НСl-буфер (pH 7,5 и 8,0) был получен от компании Invitrogen (Карлсбад, штат Калифорния), а гуманизированный стандарт моноклонального антитела IgG1κ RM 8671 был приобретен у Национальном Институте стандартов и технологий (NIST).

Деплетирование белка А. Лекарственное вещество заменяли буфером на DPBS, pH доводили до 8,4. Колонки с белком А объемом 1 мл уравнивали пятью объемами колонки DPBS. В колонку с белком А добавляли лекарственное вещество и инкубировали 4 мин при комнатной температуре. Каждую колонку промывали тремя объемами колонки DPBS и собирали элюат и проточную жидкость. Проточную жидкость раствор и элюат заменяли буфером на 50 мМ ацетат аммония с помощью центрифужных фильтров Amicon Ultra 3 кДа (Millipore) путем центрифугирования при 3000 g и 5 °C. Концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Белок из каждого образца сушили в вакууме или хранили при -80°C.

Стандартное расщепление. Образцы высушенного лекарственного вещества восстанавливали в 8 М мочеvine/100 мМ Трис-HCl. Белок восстанавливали с применением 10 мМ DTT и инкубировали в течение 30 мин при 50 °C. Образцы охлаждали до комнатной температуры и алкилировали с применением 15 мМ IAM в течение 1 часа в темноте. Смесь заменяли буфером на 100 мМ бикарбоната аммония с помощью центробежных фильтров Amicon Ultra 3 кДа (Millipore) в соответствии с инструкциями производителя. Протеолитическое расщепление проводили трипсином (соотношение трипсин:субстрат 1:20) в течение ночи при 37 °C. Расщепление гасили подкислением до 0,2% FA

Нативное расщепление. Подробное описание нативного расщепления представлено в публикации Huang et al. 2017, *supra*. Вкратце, образцы высушивали и ресуспендировали в буфере 25 мМ трис-HCl, pH 8. Образцы затем расщепляли трипсином (соотношение фермент:субстрат 1:400 мас./мас.) при 37 °C в течение ночи с конечным pH ~7,4. Затем образцы восстанавливали с применением 3 мМ DTT и инкубировали в течение 10 минут при 90 °C. Образцы подкисляли до ~0,2% FA и центрифугировали при 15000 g в течение 2 мин. Супернатант удаляли и применяли для анализа LC-MS².

НаноLC-MS². Приблизительно 1 мкг расщепленного белка вводили в колонку C18 (колонка New Objective PicoFrit, наружный диаметр 360 мкм, внутренний диаметр 75 мкм, внутренний диаметр наконечника 10 мкм, длина слоя 25 см, заполненного частицами BEH C18 [1,7 мкм, 130 Å, Waters]) с Easy-nLC (Thermo Fisher Scientific). Подвижная фаза А содержала 0,1% FA в воде, а подвижная фаза В содержала 0,1% FA в 80% ацетонитриле/20% воды. Линейный градиент LC был настроен следующим образом: 0-10 мин: 6% В, 130 мин: 50% В, 140-155 мин: 100% В. Элюант анализировали на масс-спектрометре Orbitrap Fusion Lumos Tribrid, оснащенном интерфейсом FAIMS Pro (Thermo Fisher Scientific). Поскольку деплетирование белка А и продукт нативного расщепления уменьшают динамический диапазон пептидов в образце, авторы внедрили стандартные настройки протеомики MS (в качестве примера см. публикацию Alexander S. Hebert et al., The One Hour Yeast Proteome, 13 MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS 339-347 (2013)). Вкратце, обзорное сканирование было выполнено в Orbitrap с временем цикла в одну секунду. MS сканирование имело m/z диапазон 360-1600, разрешение 60K, цель AGC 5E5 и максимальное время введения 50 мс. Фрагментацию HCD проводили между циклами

MS² с нормализованной энергией столкновения 30% с последующим анализом в ионной ловушке. сканирование имело m/z диапазон 100-2000, цель AGC 1E4 и максимальное время введения 35 мс. Продолжительность динамического исключения была установлена на 30 секунд с подсчетом одного повтора, и анализировали только предшественники с состояниями заряда от +2 до +8. Работа интерфейса FAIMS Pro была описана в публикации Hebert et al. (Alexander S. Hebert et al., Comprehensive Single-Shot Proteomics with FAIMS on a Hybrid Orbitrap Mass Spectrometer, 90 ANALYTICAL CHEMISTRY 9529-9537 (2018)). Вкратце, температура электрода FAIMS была установлена на 100 °C, поток газа-носителя FAIMS составлял 4,7 л/мин N₂, асимметричная форма волны с DV составляла -5000 В, входное напряжение пластины составляло 250 В, время установления CV составляло 25 мс, и CV были установлены на -50 В, -65 В и -85 В. Когда интерфейс FAIMS Pro не использовался для эксперимента, он удалялся из MS.

Анализ данных. Поиск в базе данных для идентификации пептидов и белков выполняли с помощью SEQUEST и Mascot, встроенных в Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Fisher Scientific), относительно базы данных мышинных белков SwissProt, которая включала общие контаминанты. Допуски по массе составляли 20 ppm для масс ионов-предшественников, проанализированных с помощью Orbitrap, и 0,5 Да для масс фрагментных ионов, проанализированных с помощью ионной ловушки. При поиске по базе данных был указан трипсин. Окисление метионина (+16 Да) было установлено как переменная модификация, а карбамидометилирование цистеина было установлено как фиксированная модификация для нормальных (алкилированных) гидролизатов. Частота ложных открытий (FDR) определялась с применением стратегии «мишень-приманка» и была установлена на уровне 1% для идентификации пептидов и 5% для идентификации белков с минимум двумя уникальными пептидами, обнаруженными на белок.

Одной из основных проблем анализа НСР с помощью LC-MS² является очень низкая концентрация НСР по сравнению с терапевтическим белком в растворе лекарственного средства (DS) (~ 1-100 нг НСР/мг продукта). Поскольку триптические пептиды ведут себя практически одинаково в масс-спектрометре независимо от белка, из которого они получены, а терапевтический белок подавляюще распространен в DS, для триптических пептидов из НСР характерно подавление сигнала и увеличение фона во время типового анализа. Для обнаружения примеси НСР с концентрацией 1 ppm, совместно элюирующейся с терапевтическим белком в DS, масс-спектрометру требуется динамический диапазон более шести порядков, что выходит за рамки возможностей современных масс-спектрометров. Это требование чувствительности требует оптимизации каждого этапа типового рабочего процесса протеомики, включая расщепление образца, хроматографию/разделение и инструментальный анализ. Однако, поскольку повышенная чувствительность является лишь одним из аспектов анализа, необходимо также учитывать ресурсы и пропускную способность образцов. Было проведено сравнение нескольких способов улучшения обнаружения НСР, чтобы сформулировать рекомендации по достижению баланса между сложностью, скоростью и

глубиной анализа. Для создания в целом сопоставимого набора данных при оптимизации протокола НСР применяли стандарт гуманизированных моноклональных антител IgG1κ Национального института стандартов и технологий (NISTmAb), но результаты продемонстрировали те же тенденции и для других протестированных терапевтических белков (данные не приведены).

Пример 12. Сравнение и оптимизация способов с применением NISTmAb

Ранее Huang et al., выше, сообщали о простом и эффективном методе решения проблемы динамического диапазона в анализе НСР, названном «нативным расщеплением». Избирательно расщепляя НСР с более низким содержанием и оставляя относительно большие и стабильные антитела интактными, указанные выше авторы значительно уменьшили интерференцию от пептидов антител и, соответственно, обнаружили гораздо большее количество НСР, чем при обычном расщеплении. Данные, полученные авторами данного изобретения, подтверждают эти результаты (Фиг. 9А); НСР были идентифицированы более чем в четыре раза по сравнению с применением продукта «нативного» расщепления по сравнению с продуктом «нормального» триптического расщепления (т. е. с восстановлением и алкилированием перед расщеплением), а также с пропорциональным увеличением количества уникальных пептидов (Таблица 1). Для сравнения авторы деплетировали образец антитела, применяя колонку с белком А (Фиг. 9В). Было обнаружено, что деплетирование белка А является более эффективной стратегией, чем нативное расщепление, с обнаружением примерно в десять раз больше НСР по сравнению с контрольным образцом (нормальное расщепление), а также с пропорциональным увеличением количества уникальных пептидов. Тем не менее, у обеих процедур есть преимущества. Например, для нативного расщепления требуется меньше подготовки образцов и исходного материала, чем для протокола с белком А, который требует как деплетирования, так и расщепления, но следует также отметить, что деплетирование белка А может быть автоматизировано, а анализ образца не требует дополнительного времени работы прибора.

Таблица 1: Количество НСР и уникальных пептидов, обнаруженных в анализах

Название образца	Кол-во уникальных пептидов	Кол-во идентифицированных НСР
Нативное расщепление, ProA и FAIMS	2838	602
Нативное расщепление и ProA	2570	511
Нормальное расщепление, ProA и FAIMS	660	185
Нормальное расщепление и ProA	617	144
Нативное расщепление и FAIMS	499	135
Нативное расщепление	344	84

Нормальное расщепление и FAIMS	55	20
Нормальное расщепление	54	17

Хотя эти данные представляют собой значительные лучшие результаты по сравнению с традиционным анализом НСР методом shotgun-протеомики, большинство пептидов, обнаруженных в приведенных выше экспериментах, все же были получены из антител, а не из представляющих интерес белков. Поэтому была протестирована комбинация нативного расщепления и деплетирования белка А, чтобы определить, можно ли дополнительно улучшить сигнал пептида НСР за счет уменьшения помех от DS по сравнению с деплетированием белка А или нативным расщеплением независимо друг от друга. Действительно, сравнение продукта нативного расщепления с продуктом нативного расщепления после деплетирования белка А демонстрирует заметное повышение чувствительности по сравнению с тем, что уже могут обеспечить эффективные отдельные способы (Фиг. 9С). В результате комбинирования деплетирования белка А и нативного расщепления было обнаружено 511 НСР в образце очищенного DS, что намного больше, чем в образце нативного расщепления (идентифицировано 84 НСР) и деплетирования белка А с образцом нормального расщепления (идентифицировано 144 НСР). Кроме того, эти результаты в значительной степени дополняют друг друга: более 99% НСР, обнаруженных в предыдущих анализах NISTmAb, также были идентифицированы в образце нативного расщепления с деплетированием белка А. Это указывает на отсутствие необъективности при идентификации белка между этими стратегиями деплетирования и расщепления. Учитывая частоту, с которой НСР очищаются вместе с терапевтическим белком (см. публикации Aboulaich et al., выше; Levy et al. (2014), выше; и Levy et al., (2018), выше), существует разумное опасение, что деплетирование белка А или любой другой способ, который деплетирует терапевтический белок или обогащает НСР, также может непреднамеренно удалить НСР. Однако, поскольку практически все НСР, обнаруженные в анализах без деплетирования белка А, были также обнаружены в образцах с деплетированным белком А, увеличение чувствительности более чем перевешивает любые потери из-за взаимодействия между НСР и белком А или терапевтическим белком.

Эти результаты подчеркивают важность уменьшения фоновых помех от DS. Однако после комбинирования нескольких способов деплетирования авторы данного изобретения обнаружили, что дальнейшее удаление DS больше не было полезным, поскольку основные пики, обнаруженные в образцах нативного расщепления с деплетированным белком А больше не были исключительно из пептидов DS, а представляли собой комбинацию НСР, белка А, продуктов автолизиса трипсина и других пептидов. По сути, динамический диапазон между наиболее распространенными и наименее распространенными пептидами сократился примерно до двух порядков, и, таким образом, дальнейшее удаление терапевтического белка вряд ли повысит чувствительность к НСР. Однако этот анализ также демонстрирует, насколько являются комплексными очищенные образцы DS после того, как терапевтический белок был деплетирован: в

одном образце обнаружено более 500 белков и тысячи пептидов (Таблица 1). Поэтому представляется вероятным, что лучшее разделение пептидов и более быстрый MS-анализ будут способствовать дальнейшему увеличению глубины анализа. Действительно, эта стратегия, вероятно, повысит уровень идентификации белка в большинстве анализов shotgun-протеомики. Однако важно учитывать дополнительную комплексность таких стратегий. Применение фракционирования для анализа НСР, например, обсуждалось ранее (Kufer et al., см. выше). Хотя было обнаружено, что фракционирование DS по-прежнему является полезным, оно обуславливает значительное увеличение времени работы прибора, что проблематично для рутинных анализов. Ионная подвижность является альтернативой, которая может обеспечить те же преимущества, что и фракционирование, без дополнительной подготовки образца и увеличения времени работы прибора (см. Doneanu et al. (2015), выше).

Пример 13. Сравнение и оптимизация способов с применением NISTmAb

Спектрометрию ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля (FAIMS) исследовали как возможный метод, который можно было бы применять вместо фракционирования пептидов DS. Обзор FAIMS подробно описан в другом месте (см. публикацию Hebert et al. (2018), выше). Вкратце, ячейка FAIMS находится на интерфейсе между эмиттером нанораспыления и передающей трубкой масс-спектрометра; внутри находится круглый электрод, к которому можно прикладывать компенсационные напряжения (CV). Это позволяет разделять ионы в газовой фазе до того, как они попадут в масс-спектрометр. Поскольку CV можно быстро изменить (~ 25 миллисекунд/переход), можно переключаться между несколькими CV в течение одного цикла и тем самым упростить отдельные сканирования.

В качестве примера, рассматривается один и тот же образец с FAIMS и без нее, как продемонстрировано на Фиг. 10. Даже в образцах, которые являются деплетированными по терапевтическому белку, например, колонка с белком А и нативное расщепление, многие из обнаруженных основных пептидов по-прежнему происходят из терапевтического белка. Полное сканирование MS во время элюирования этих пептидов выявило несколько ионов, представляющих потенциальный интерес. В то время как основной ион DS пептида присутствует в большом количестве, есть несколько других ионов в более низком количестве, которые могут быть пептидами НСР и требуют анализа, но не могут быть выбраны для фрагментации MS² до начала элюирования следующих пиков. Это вызывает особую озабоченность, поскольку ионы НСР часто на два порядка менее интенсивны, чем ионы пептида DS, даже в образцах, где терапевтический белок был деплетирован. Напротив, если один и тот же образец анализируется с применением ячейки FAIMS с тремя разными CV, получаются три уникальные хроматограммы основных пиков (BPC). При CV -50 В, BPC является аналогичной образцу без FAIMS, и в полном MS спектре наблюдается тот же основной ион пептида DS. В спектрах с CV -85 и -65 В ион пептида DS исчезает, что позволяет анализировать пептиды НСР, которые не были обнаружены без FAIMS. В этом примере FAIMS фактически фракционирует образец

на три разных цикла без какого-либо значительного увеличения рабочего цикла или дополнительных этапов подготовки образца.

Основным преимуществом FAIMS для анализа НСР является ее способность уменьшать комплексность образца, позволяя обнаруживать меньшее количество пептидов. В принципе, этот способ аналогичен другим типам фракционирования и не требует дополнительной подготовки образца или увеличения времени работы прибора. Кроме того, снижение фонового шума благодаря фильтрующему эффекту FAIMS также позволяет лучше выбирать ионы-предшественники и улучшать MS^2 спектры, повышая достоверность ID пептидов. Хотя интерфейс FAIMS потенциально может уменьшить сигнал, любое уменьшение сигнала сопровождается уменьшением фонового шума (т. е. в большинстве наблюдаемых случаев улучшается отношение «сигнал/шум»). Было обнаружено, что добавление FAIMS увеличивает идентификацию НСР на ~20% по сравнению с образцами, запущенными в цикл без FAIMS (Таблица 1 и Фиг. 9D).

С помощью этого оптимизированного рабочего процесса было не только идентифицировано большое количество НСР (602 в образце нативного расщепления, деплетированным по белку А, с помощью FAIMS), но и оказалось, что указанный процесс является очень надежным и хорошо согласуется с ранее описанными способами. Воспроизводимость является особенно важной, когда речь идет об анализе ДС на содержание НСР, и авторы обнаружили, что описанные в данном документе методы вполне воспроизводимы (Фиг. 11). Например, идентификация НСР в оптимизированном способе, описанном выше, различается не более чем 4% между повторными образцами. Было заметно широкое перекрытие даже между различными методами или приготовлениями образцов, как продемонстрировано на Фиг. 12. 63 белка, уникальных для образца нативного расщепления, деплетированным по белку А, обнаруженного без помощи FAIMS, демонстрируют, что максимальное количество НСР может быть получено путем объединения идентификаций, полученных после запуска образца в цикл один раз с помощью FAIMS и один раз без FAIMS. Эти результаты также хорошо согласуются с данными, опубликованными в литературе, с идентификацией 59 из 60 белков, описанных Huang et al., выше, с применением оптимизированного протокола, предложенного авторами данного изобретения (ФИГ. 9E). Эта согласованность между повторностями и протоколами обеспечивает мощное обоснование применения этих методов в рутинном анализе НСР во время изготовления биофармацевтических препаратов.

Этот многофакторный подход (продемонстрирован на ФИГ. 13), при котором сначала деплетируется образец антитела на колонке с белком А, затем специфически расщепляются НСР, преципитируя любое оставшееся антитело, и, наконец, уменьшается спектральная комплексность за счет shotgun-протеомики и переключения компенсационного напряжения (CV) с применением спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля (FAIMS), которая позволяет получить на порядок большую аналитическую глубину, чем любой отдельный способ, сохраняя при

этом простоту и высокую производительность, необходимые для рутинного анализа НСР.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца, включающий: обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения в контакт матрицы образца с подложкой для аффинной хроматографии; выполнение фракционирования на проточной жидкости из аффинной хроматографии; а также характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что подложка для аффинной хроматографии представляет собой подложку для хроматографии с белком А.
3. Способ по п. 1, дополнительно включающий промывание подложки для аффинной хроматографии промывочным буфером и сбор проточной жидкости.
4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что подложка для аффинной хроматографии содержит белок А или белок G.
5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что белок А или белок G иммобилизованы на агарозной или сефарозной смоле.
6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой tandemный масс-спектрометр.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.
8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что система жидкостной хроматографии представляет собой систему наножидкостной хроматографии.
9. Способ по п. 1, дополнительно включающий характеристику по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью устройства для спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.
10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что матрица образца дополнительно содержит представляющий интерес белок.
11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что представляющий интерес белок представляет собой антитело.
12. Способ по п. 10, отличающийся тем, что представляющий интерес белок представляет собой слитый белок.
13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фракционирование представляет собой фракционирование на основе размера.
14. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фракционирование представляет собой фракционирование на основе гидрофобности.
15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фракционирование представляет собой фракционирование на основе заряда.
16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фракционирование представляет собой фракционирование на основе pI.
17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что фракционирование включает

фракционирование с помощью жидкостной хроматографии.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что жидкостная хроматография представляет собой обращенно-фазовую жидкостную хроматографию.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ позволяет охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, который обогащает белки клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии без проведения этапа фракционирования.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% больше белков клетки-хозяина, чем способ, который выполняет фракционирование без обогащения белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии.

21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% - 70% больше белков клетки-хозяина, чем способ, который обогащает белки клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии без проведения этапа фракционирования.

22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 50% - 75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, который выполняет фракционирование без обогащения белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения матрицы образца в контакт с подложкой для аффинной хроматографии.

23. Способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца, содержащей представляющий интерес белок, при этом указанный способ включает:

обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения в контакт матрицы образца с подложкой для аффинной хроматографии;

промывание подложки для аффинной хроматографии промывочным буфером;

сбор проточной жидкости;

выполнение фракционирования образца, полученного после выполнения этапа обогащения; а также

характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

24. Способ по п. 23, отличающийся тем, что проточная жидкость имеет меньшее количество представляющего интерес белка, чем матрица образца.

25. Способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца, включающий:

обогащение белков клетки-хозяина в указанной смеси путем приведения в контакт матрицы образца с подложкой для аффинной хроматографии с получением смеси;

помещение смеси в условия неденатурирующего расщепления; а также

характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью масс-спектрометра.

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что подложка для аффинной хроматографии представляет собой подложку для хроматографии с белком А.

27. Способ по п. 25, дополнительно включающий сбор проточной жидкости из подложки для аффинной хроматографии.

28. Способ по п. 25, отличающийся тем, что подложка для аффинной хроматографии содержит белок А или белок G.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что белок А или белок G иммобилизованы на агарозной или сефарозной смоле.

30. Способ по п. 25, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой tandemный масс-спектрометр.

31. Способ по п. 25, отличающийся тем, что масс-спектрометр соединен с системой жидкостной хроматографии.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что система жидкостной хроматографии представляет собой систему наножидкостной хроматографии.

33. Способ по п. 25, отличающийся тем, что масс-спектрометр представляет собой спектрометр ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

34. Способ по п. 28, отличающийся тем, что матрица образца дополнительно содержит представляющий интерес белок.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что представляющий интерес белок представляет собой по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из антитела или его фрагмента или производного, слитого белка и физиологически активного белка, не являющегося антителом.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 500% больше белков клетки-хозяина, чем способ, который подвергает смесь воздействию неденатурирующих условий расщепления с образованием смеси без обогащения белков клетки-хозяина в указанной смеси за счет приведения в контакт матрицы образца с подложкой для аффинной хроматографии с получением смеси.

37. Способ по п. 34, отличающийся тем, что указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 100% - 1000% больше белков клетки-хозяина, чем способ, который подвергает смесь воздействию неденатурирующих условий расщепления с образованием смеси без обогащения белков клетки-хозяина в указанной смеси за счет приведения в контакт матрицы образца с подложкой для аффинной хроматографии с получением смеси.

38. Способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца, включающий:

обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения в контакт матрицы образца с подложкой для аффинной хроматографии; и

характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 30% больше белков клетки-хозяина, чем способ, не включающий спектрометрию ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

40. Способ по п. 38, отличающийся тем, что указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 30% - 75% больше белков клетки-хозяина, чем способ, не включающий спектрометрию ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

41. Способ характеристики белков клетки-хозяина в матрице образца, включающий:

обогащение белков клетки-хозяина в матрице образца путем приведения в контакт матрицы образца с подложкой для аффинной хроматографии с получением смеси;

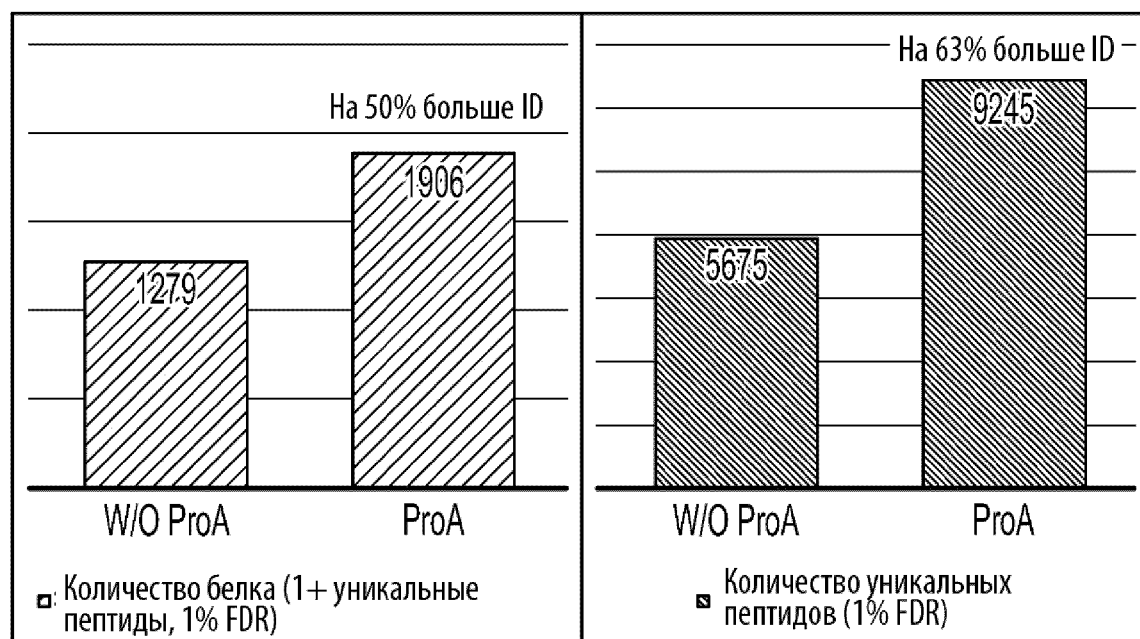
помещение смеси в условия неденатурирующего расщепления; а также

характеризацию по меньшей мере одного из белков клетки-хозяина с помощью спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 15% больше белков клетки-хозяина, чем способ, который обогащает белки клетки-хозяина в матрице образца путем приведения в контакт матрицы образца с подложкой для аффинной хроматографии с получением смеси, подвергает полученную смесь неденатурирующим условиям расщепления и характеризует по меньшей мере один из белков клетки-хозяина с помощью устройства для масс-спектрометрии, отличного от устройства для спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

43. Способ по п. 41, отличающийся тем, что указанный способ способен охарактеризовать по меньшей мере на около 15% - 60% больше белков клетки-хозяина, чем способ, который обогащает белки клетки-хозяина в матрице образца путем приведения в контакт матрицы образца с подложкой для аффинной хроматографии с получением смеси, подвергает полученную смесь неденатурирующим условиям расщепления и характеризует по меньшей мере один из белков клетки-хозяина с помощью устройства для масс-спектрометрии, отличного от устройства для спектрометрии ионной подвижности с асимметричной формой волны сильного поля.

По доверенности

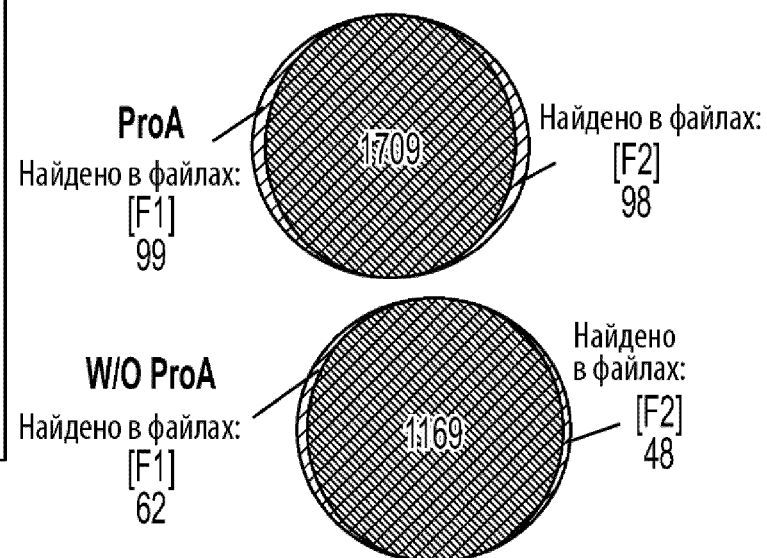


Деплетирование белка А улучшает идентификацию НСР в собранном пуле в результате удаления DS из образца

Фиг. 1

Воспроизводимость повторности

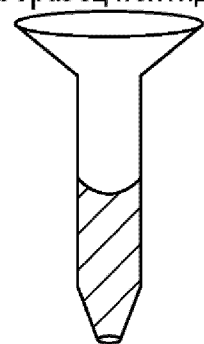
ID белка на образец 1+ уникальный пептид 1% FDR



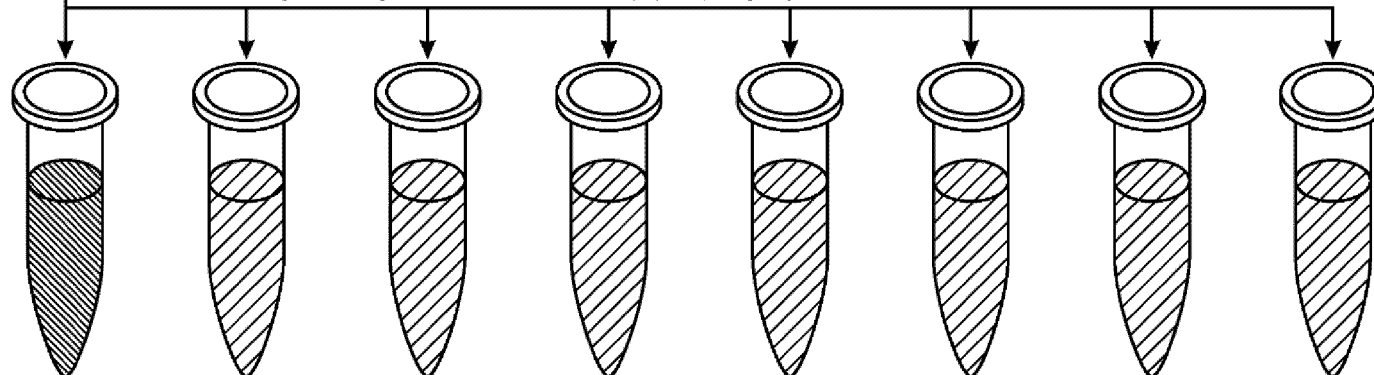
1/13

574127

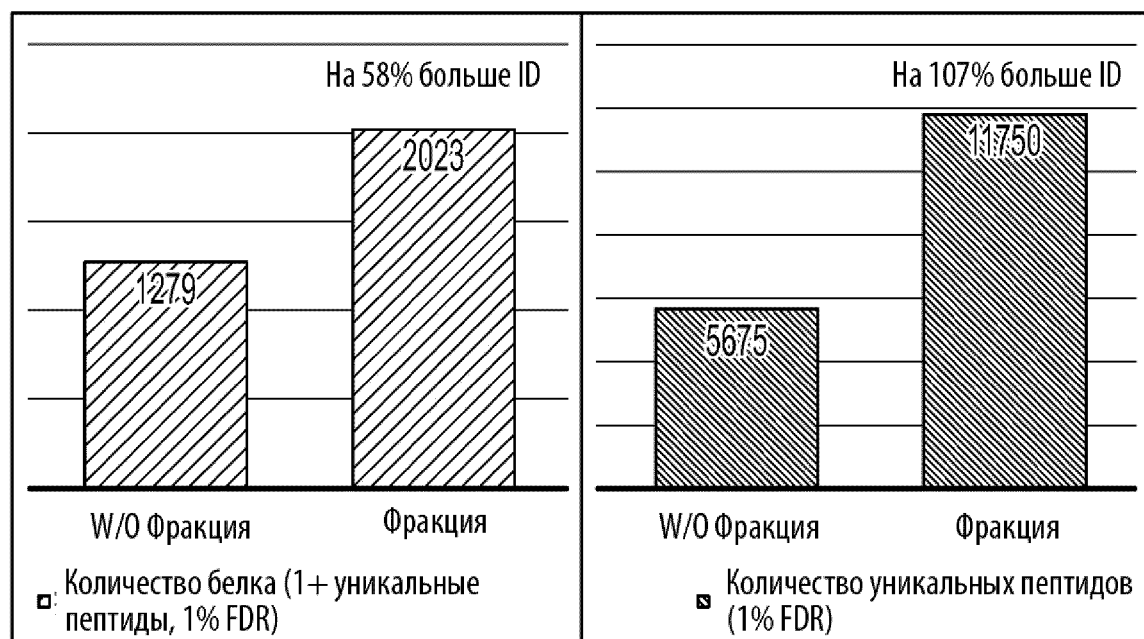
Образец пептида



Основной рН, возрастающее количество гидрофобных пептидов

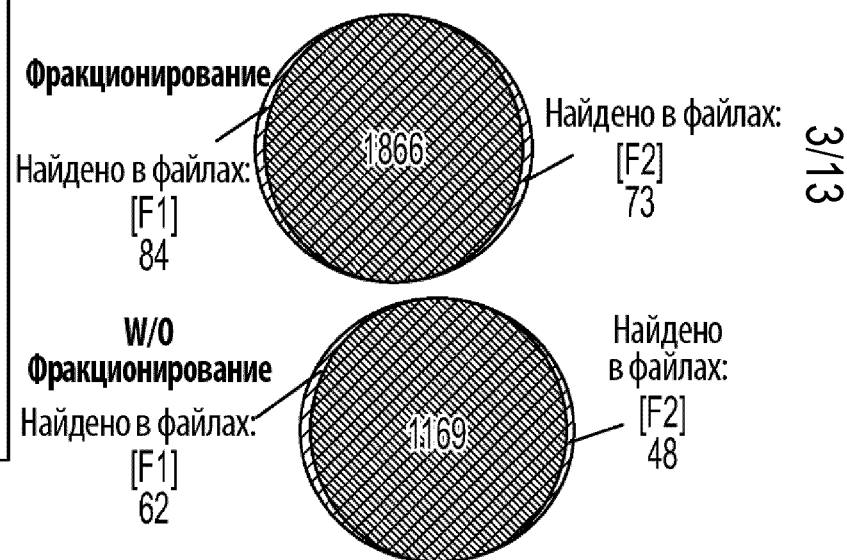


Фиг. 2

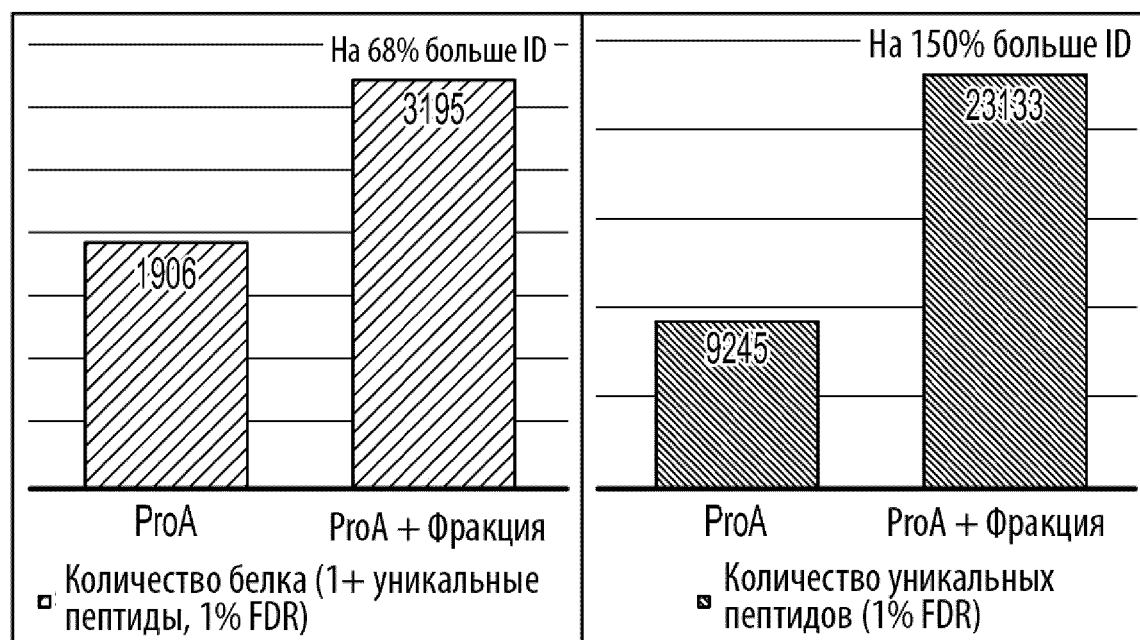


Фракционирование значительно улучшает идентификацию НСР в собранном пуле за счет снижения комлексности MS образца

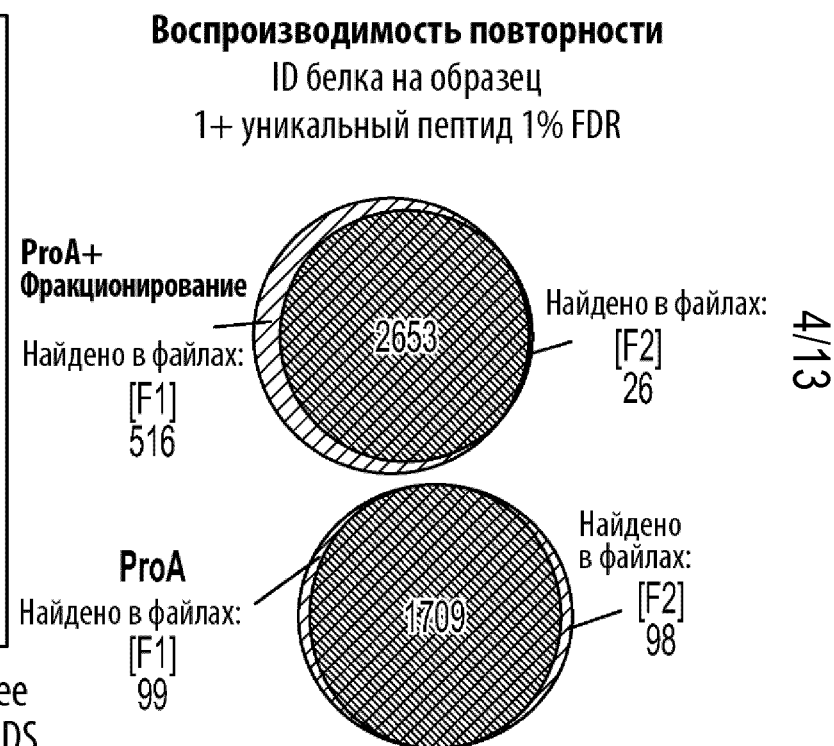
Воспроизводимость повторности
ID белка на образец 1+ уникальный пептид 1% FDR



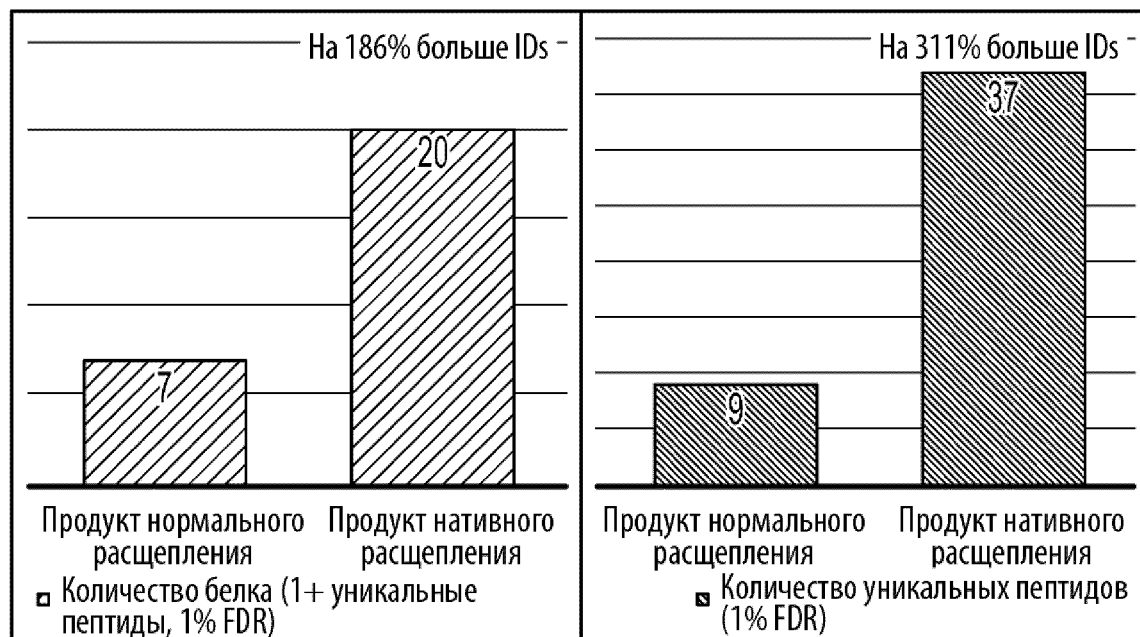
Фиг. 3



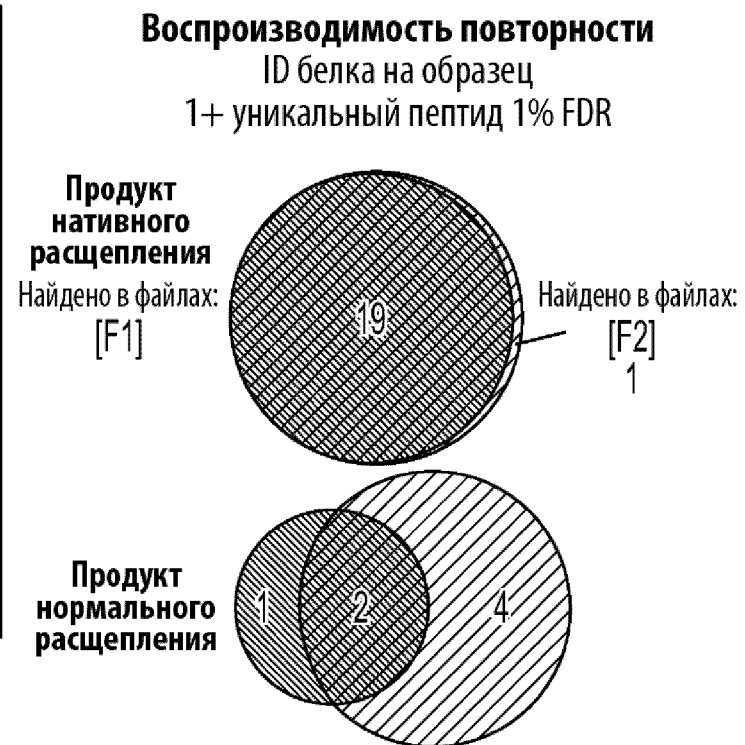
При деплетировании белка А + фракционировании выявили наибольшее количество НСР за счет снижения комлексности MS образца и удаления DS



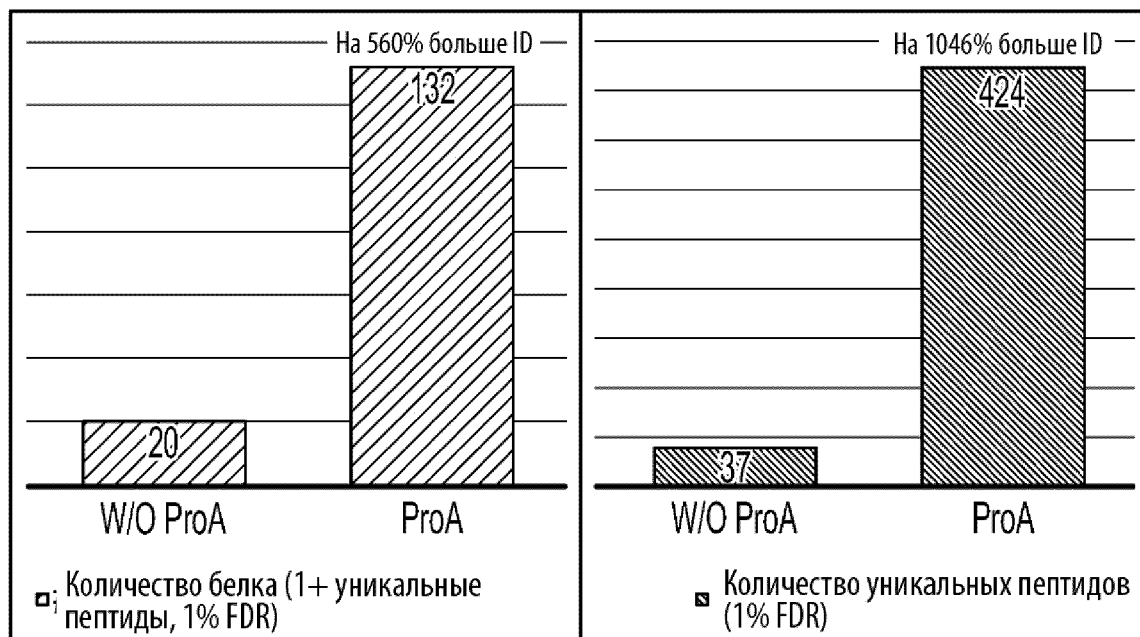
Фиг. 4



Нативное расщепление улучшает идентификацию НСР в образце DS, оставляя DS интактным



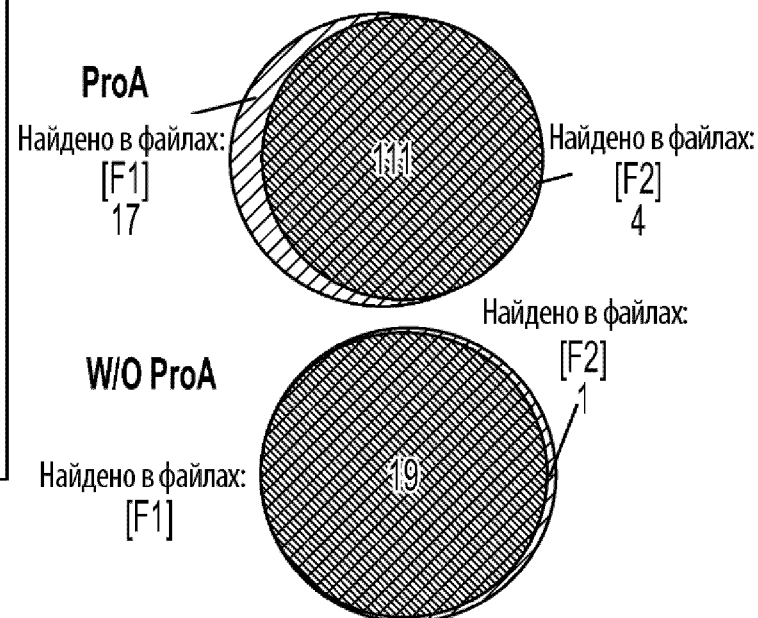
Фиг. 5



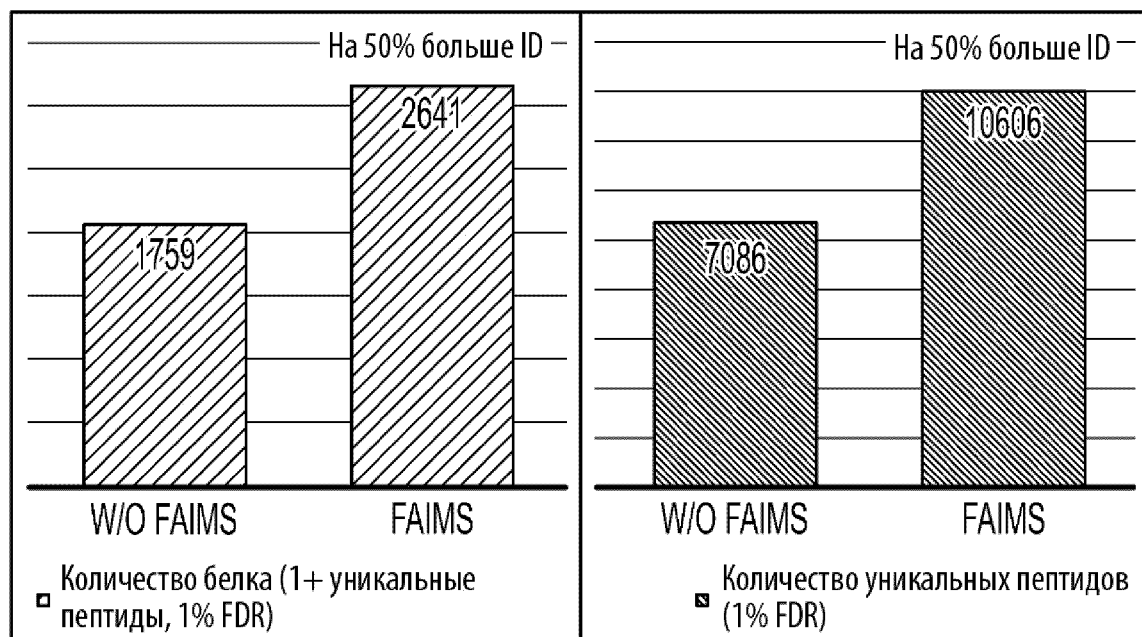
Деплетирование белка А с нативным расщеплением значительно увеличивает идентификацию НСР в DS

Воспроизводимость повторности

ID белка на образец
1+ уникальный пептид 1% FDR



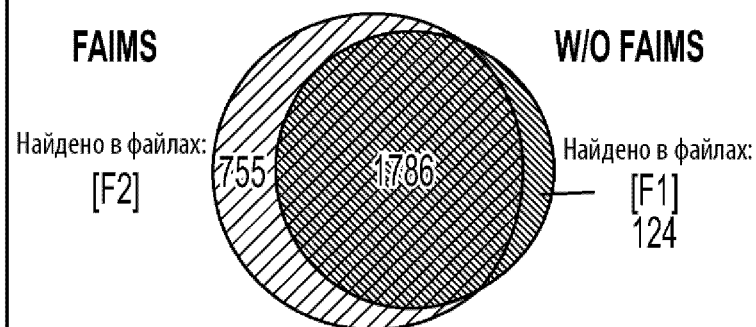
Фиг. 6



FAIMS улучшает идентификацию НСР с применением деплетирования белка А в собранном материале

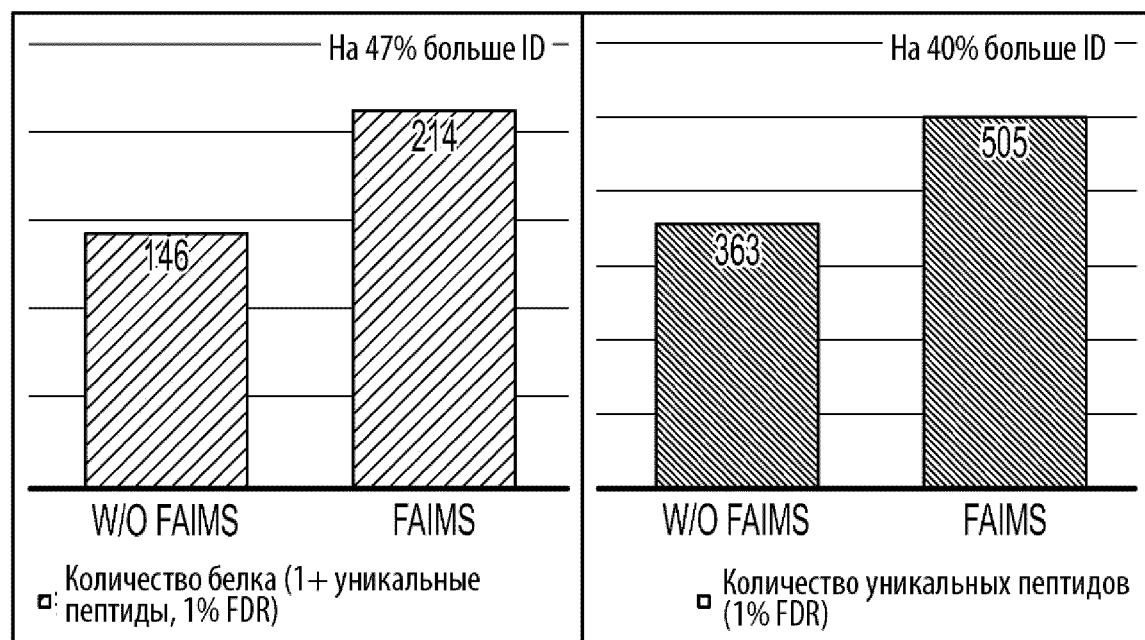
FAIMS (желтый) в сравнении с W/O FAIMS (оранжевый)

ID белка на образец
1+ уникальный пептид 1% FDR



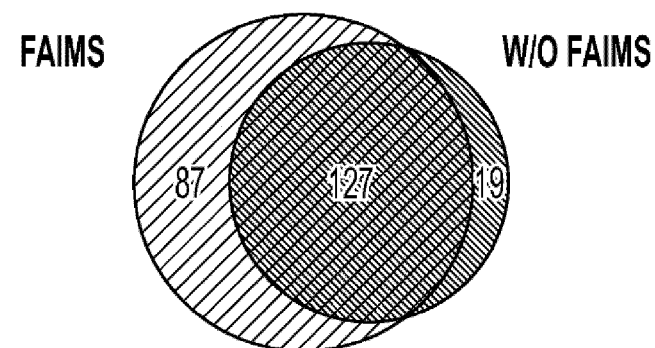
7/13

Фиг. 7

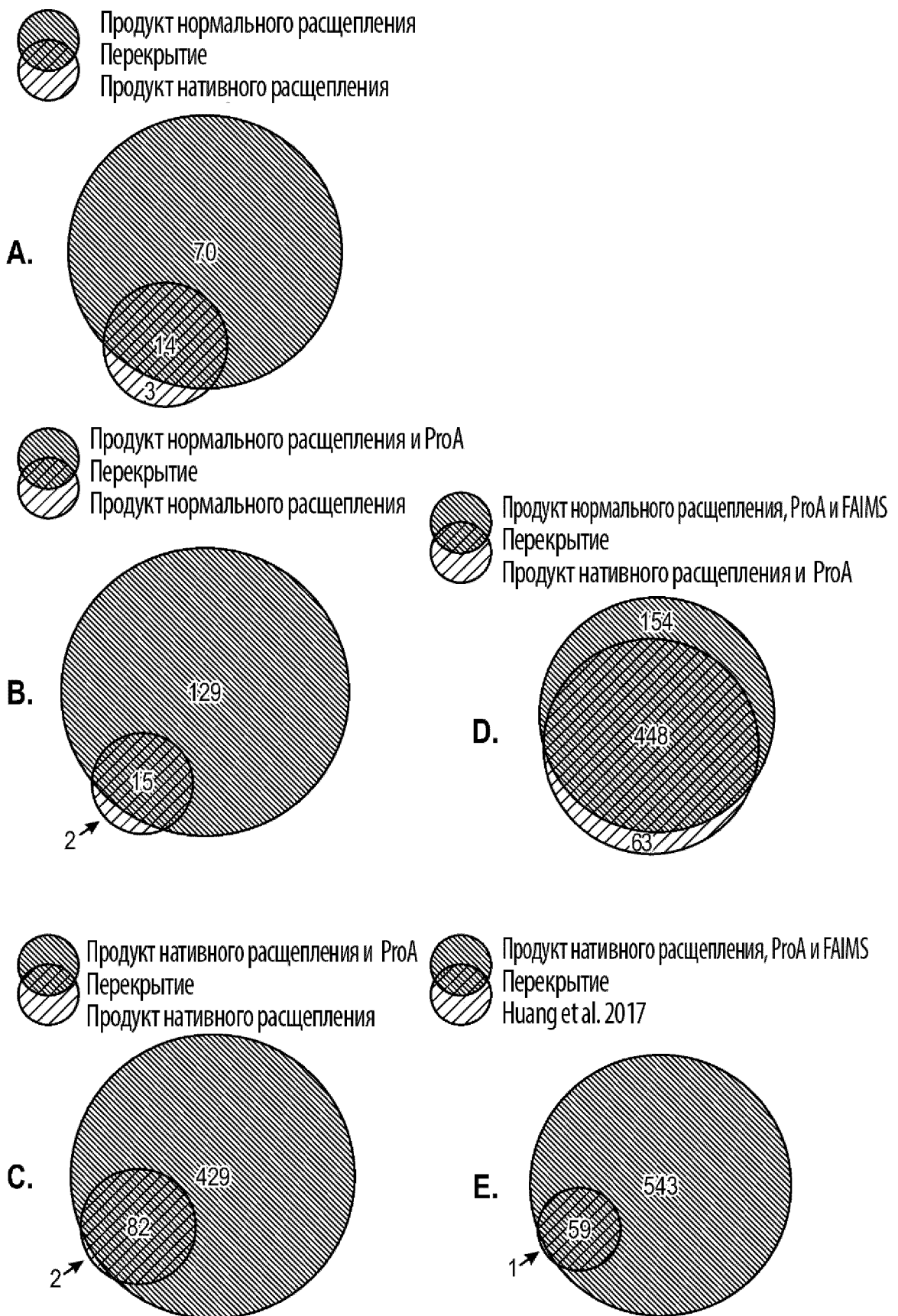


FAIMS улучшает идентификацию НСР с применением деплетирования белка А с нативным расщеплением в DS.

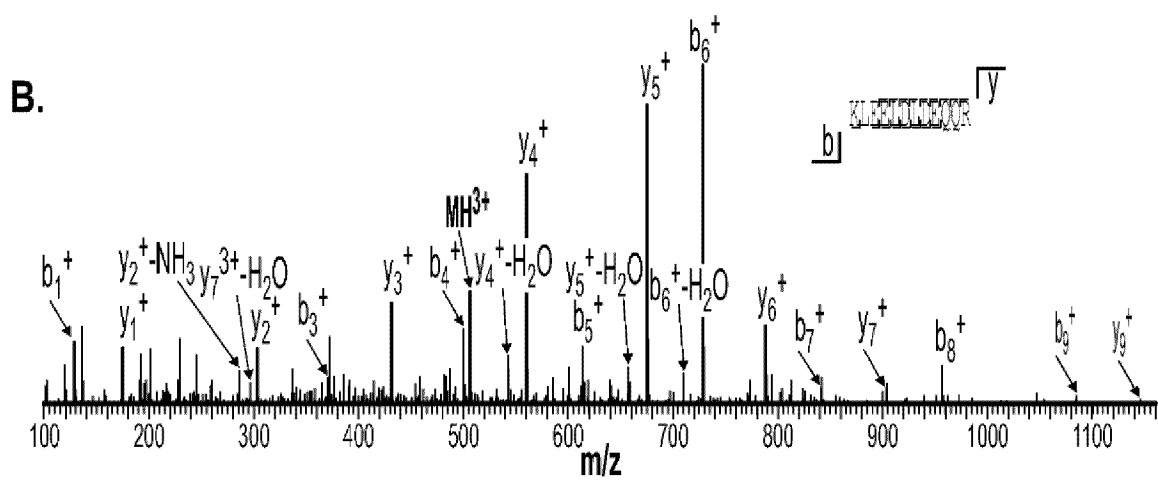
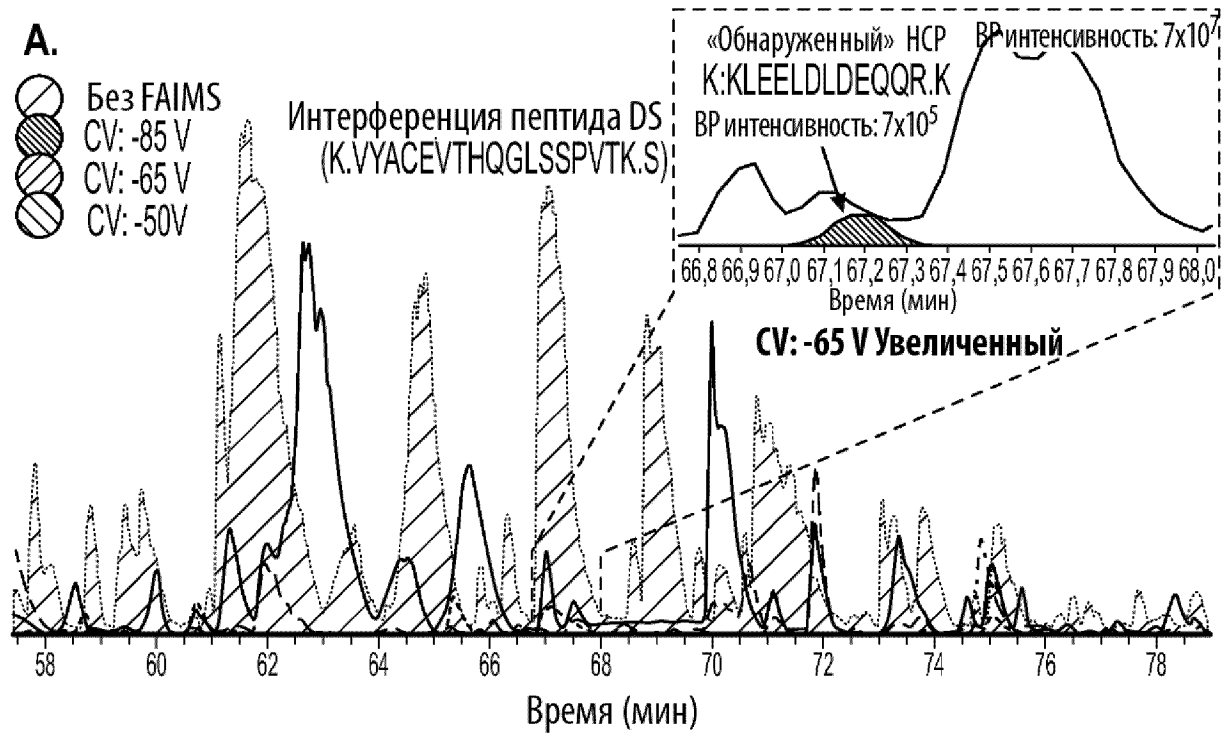
FAIMS (желтый) в сравнении с W/O FAIMS (оранжевый)
 ID белка на образец
 1+ уникальный пептид 1% FDR



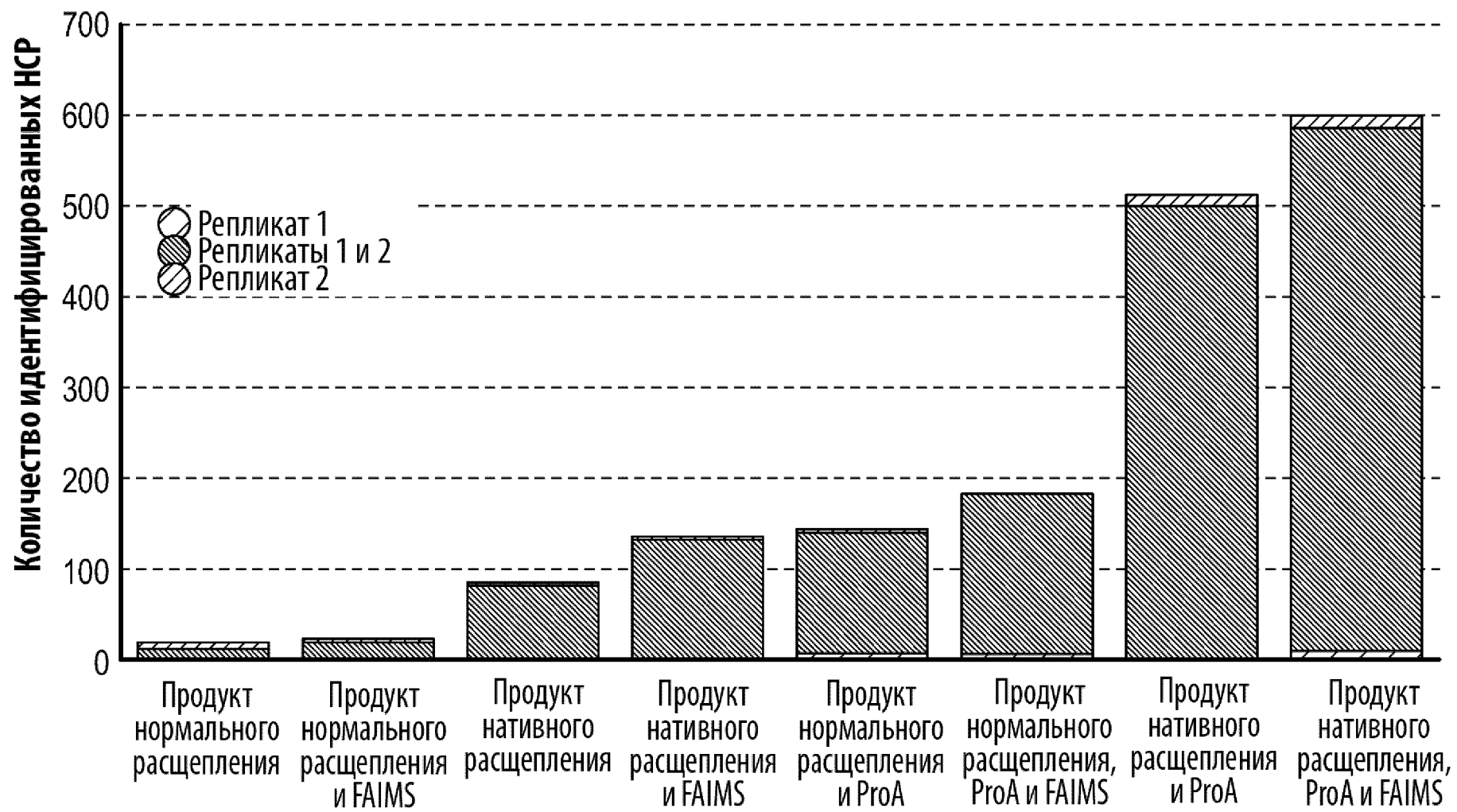
Фиг. 8



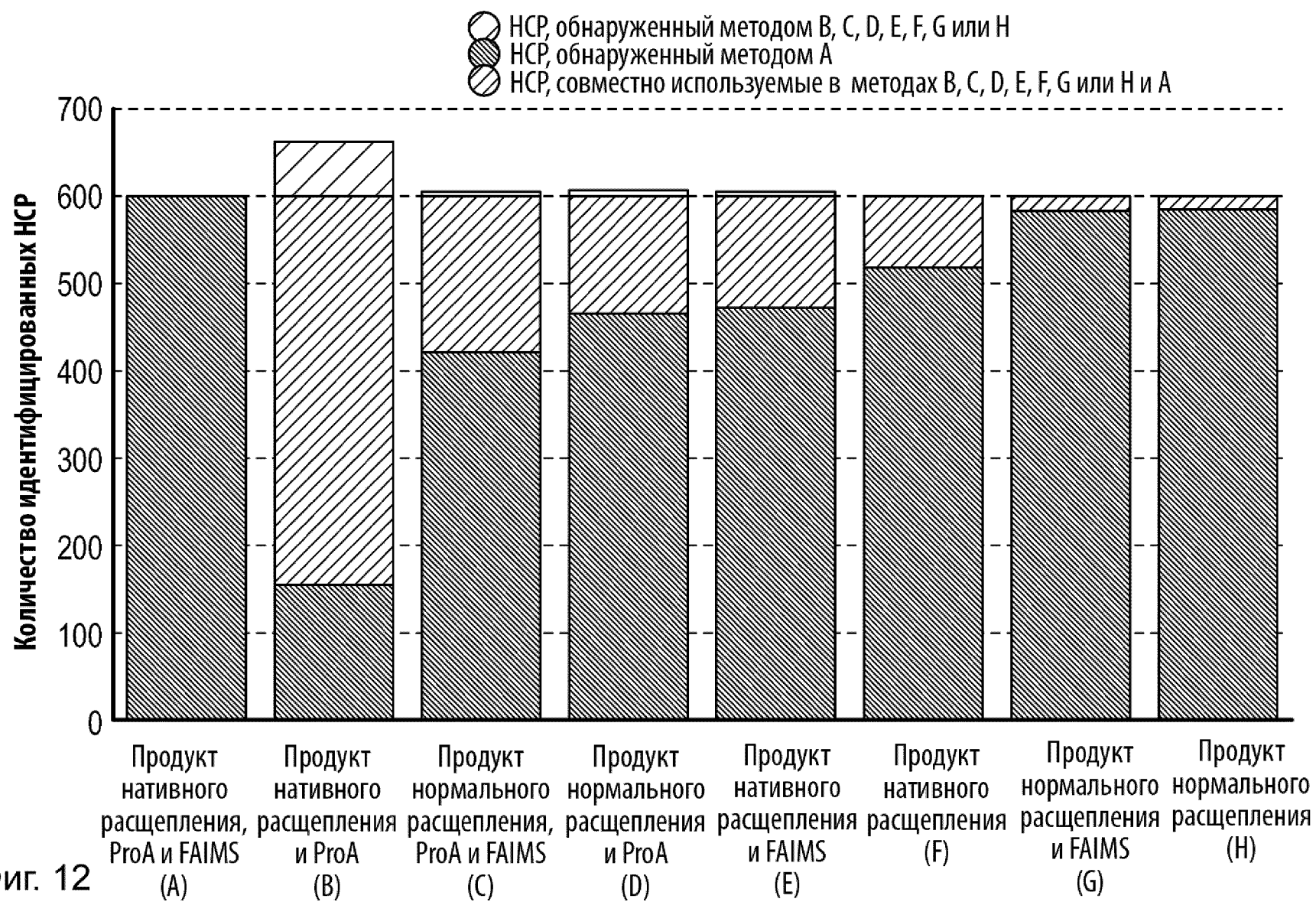
Фиг. 9



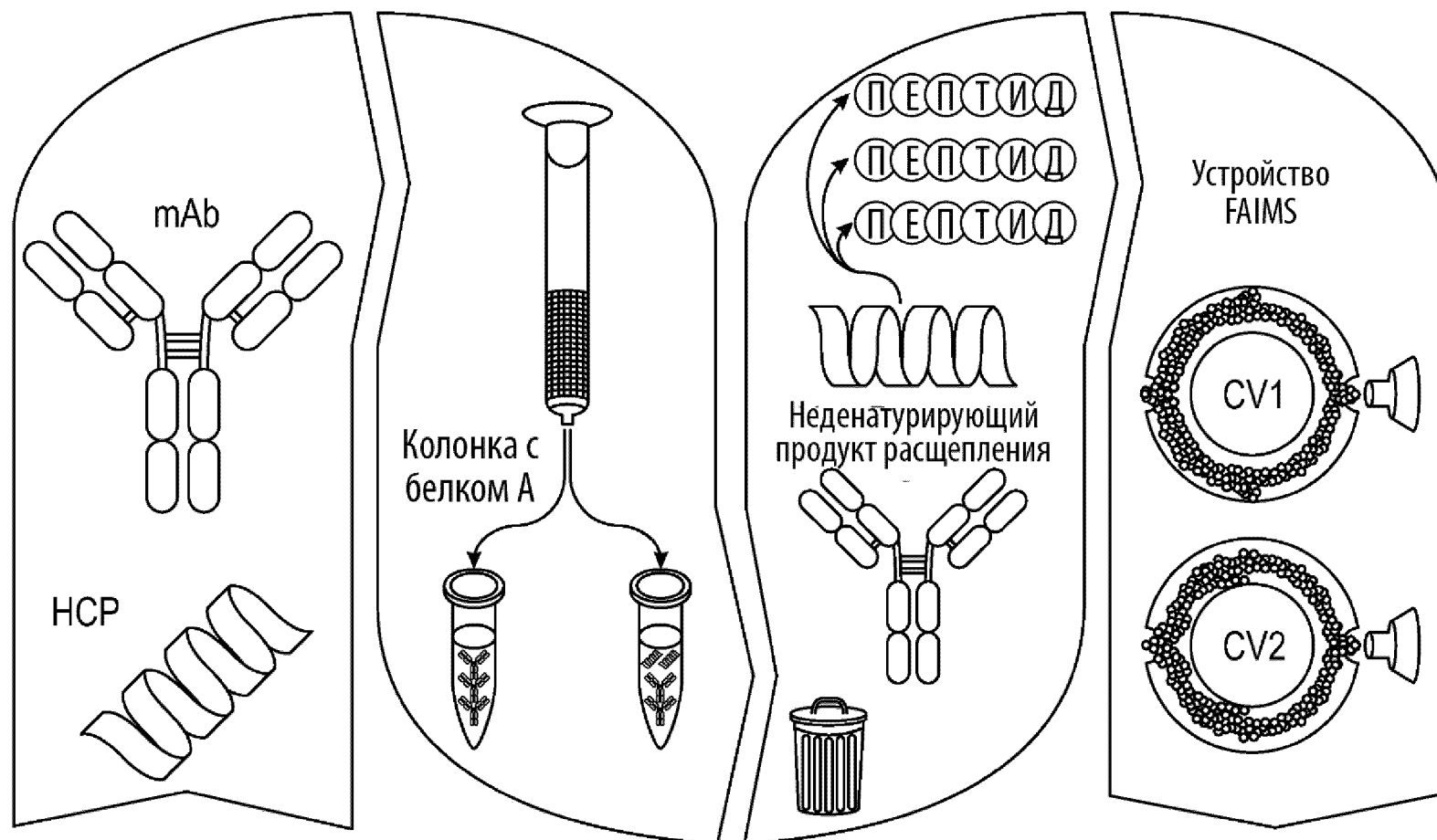
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13