

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292235 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.19(51) Int. Cl. G01N 33/68 (2006.01)
G01N 30/86 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2021.01.29

(54) ВЫСОКОДОСТОВЕРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

(31) 62/968,525

(32) 2020.01.31

(33) US

(86) PCT/US2021/015806

(87) WO 2021/155219 2021.08.05

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

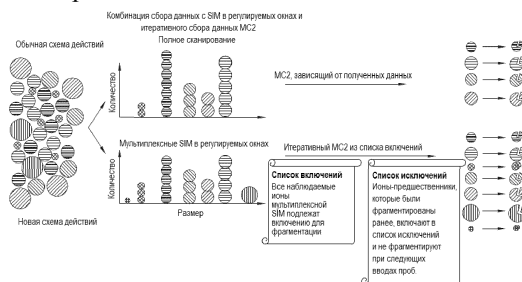
(72) Изобретатель:

У Цзикан, Ван Хунся, Цю Хайбо, Ли
Нин (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны способы усовершенствования обнаружения и определения характеристик соединений. Описаны способы определения характеристик образца. Предложенные способы могут включать подачу образца в систему жидкостной хроматографии, выполненную с возможностью разделения образца с получением компонентов образца; анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) с получением списка включений; и выполнение итеративного сбора данных в зависимости от данных масс-спектра (DDA) из списка включений для идентификации отдельных компонентов образца, что обеспечивает определение характеристик образца. В одном примере использованы мультиплексные прицельные SIM и итеративный сбор данных DDA MC2 для улучшения надежной идентификации соединений для анализа среды для культивирования клеток.



202292235

A1

A1

202292235

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575180EA/019

ВЫСОКОДОСТОВЕРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОМАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[001] Настоящее изобретение относится к идентификации соединений и, в частности, к способу высокодостоверной идентификации соединений методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ЖХ-МС), например, для усовершенствования технологий получения антител.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[002] Среда для культивирования клеток играет ключевую роль при получении антител. Весьма желательно и сложно сформировать более глубокое понимание того, как отдельные компоненты и их метаболиты в среде для культивирования клеток влияют на производственные показатели. Несмотря на переход к использованию сред с определенным химическим составом, по-прежнему широко используется среда на основе сои. Показано, что основные компоненты и примеси в соевых гидролизатах влияют на продуктивность и качество антител. Масс-спектрометрия играет важную роль для количественного определения и идентификации соединений в очень сложных матрицах. Анализ на основе жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ЖХ-МС) может быть значительно улучшен при повышении качества данных, что в дальнейшем может обеспечить усовершенствование определения характеристик с большей достоверностью и меньшей неопределенностью.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[003] В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ определения характеристик образца, включающий: подачу образца в систему жидкостной хроматографии, выполненную с возможностью разделения образца с получением компонентов образца; анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (selected ion monitoring, SIM) с получением списка включений; и выполнение итеративного сбора данных в зависимости от данных масс-спектра (data-dependent acquisition, DDA) из списка включений для идентификации отдельных компонентов образца, что обеспечивает определение характеристик образца.

[004] В некоторых вариантах реализации система жидкостной хроматографии представляет собой систему обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФЖХ).

[005] В некоторых вариантах реализации анализ ионизированного образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает использование ионной ловушки или масс-анализатора орбитрэп.

[006] В некоторых вариантах реализации выполнение итеративного сбора данных в зависимости от данных масс-спектра (DDA) включает использование ионной ловушки или масс-анализатора орбитрэп, оснащенного сегментированным квадрупольным масс-

фильтром.

[007] В некоторых вариантах реализации анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает сегментирование настроек окна отношения массы, в который включены несколько сегментов, и каждый сегмент имеет несколько окон.

[008] В некоторых вариантах реализации несколько сегментов представляют собой три сегмента.

[009] В некоторых вариантах реализации несколько сегментов представляют собой четыре сегмента.

[0010] В некоторых вариантах реализации несколько окон представляют собой 10 окон.

[0011] В некоторых вариантах реализации все окна в сегменте имеют одинаковую ширину окна.

[0012] В некоторых вариантах реализации образец представляет собой среду для культивирования клеток.

[0013] В некоторых вариантах реализации среда для культивирования клеток представляет собой среду на основе сои для культивирования клеток.

[0014] В некоторых вариантах реализации среда для культивирования клеток предназначена для системы продуцирования на основе рекомбинантных клеток.

[0015] В некоторых вариантах реализации предложенный способ предназначен для определения характеристик компонентов и их метаболитов в среде для культивирования клеток после инкубации в системе продуцирования на основе рекомбинантных клеток.

[0016] В некоторых вариантах реализации система продуцирования на основе рекомбинантных клеток представляет собой систему млекопитающего.

[0017] В некоторых вариантах реализации система продуцирования на основе рекомбинантных клеток предназначена для продуцирования белка.

[0018] В некоторых вариантах реализации белок представляет собой антитело, белок слияния, рекомбинантный белок или их комбинацию.

[0019] В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой моноклональное антитело.

[0020] В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или к смешанному изотипу.

[0021] Также описан способ идентификации соединения для анализа среды для культивирования клеток, включающий: подачу образца среды для культивирования клеток в систему жидкостной хроматографии, выполненную с возможностью разделения образца с получением компонентов образца; анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) с получением списка включений; и выполнение итеративного сбора данных в зависимости от данных масс-спектра (DDA) из списка включений для идентификации отдельных соединений в среде для культивирования клеток.

[0022] В некоторых вариантах реализации система жидкостной хроматографии представляет собой систему обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФЖХ).

[0023] В некоторых вариантах реализации анализ фрагментированного образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает использование ионной ловушки или масс-анализатора орбитрэп.

[0024] В некоторых вариантах реализации выполнение итеративного сбора данных в зависимости от данных масс-спектра (DDA) включает использование ионной ловушки или масс-анализатора орбитрэп, оснащенного сегментированным квадрупольным масс-фильтром.

[0025] В некоторых вариантах реализации анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает сегментирование настроек окна отношения массы, в который включены несколько сегментов, и каждый сегмент имеет несколько окон.

[0026] В некоторых вариантах реализации несколько сегментов представляют собой три сегмента.

[0027] В некоторых вариантах реализации несколько сегментов представляют собой четыре сегмента.

[0028] В некоторых вариантах реализации несколько окон представляют собой 10 окон.

[0029] В некоторых вариантах реализации все окна в сегменте имеют одинаковую ширину окна.

[0030] В некоторых вариантах реализации среда для культивирования клеток представляет собой среду на основе сои для культивирования клеток.

[0031] В некоторых вариантах реализации среда для культивирования клеток предназначена для системы продуцирования на основе рекомбинантных клеток.

[0032] В некоторых вариантах реализации образец среды для культивирования клеток представляет собой образец среды для культивирования клеток, полученный после инкубации в системе продуцирования на основе рекомбинантных клеток.

[0033] В некоторых вариантах реализации система продуцирования на основе рекомбинантных клеток представляет собой систему млекопитающего.

[0034] В некоторых вариантах реализации система продуцирования на основе рекомбинантных клеток предназначена для продуцирования белка.

[0035] В некоторых вариантах реализации белок представляет собой антитело, белок слияния, рекомбинантный белок или их комбинацию.

[0036] В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой моноклональное антитело.

[0037] В некоторых вариантах реализации моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или к смешанному изотипу.

[0038] В различных вариантах реализации любые из признаков или компонентов

вариантов реализации, рассмотренных выше или в данном документе, можно комбинировать, и такие комбинации входят в объем настоящего описания. Любое конкретное значение, рассмотренное выше или в данном документе, можно комбинировать с другим родственным значением, рассмотренным выше или в данном документе, для описания диапазона, в котором указанные значения представляют собой верхний и нижний предел диапазона, и такие диапазоны и все значения, входящие в такие диапазоны, входят в объем настоящего описания. Каждое из значений, рассмотренных выше или в данном документе, может быть выражено с отклонением, составляющим 1%, 5%, 10% или 20%. Другие варианты реализации станут понятны при прочтении следующего подробного описания.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0039] На **фиг. 1** представлено схематическое изображение двух типов сбора данных MC1: (1) обычный сбор данных MC1 при полном сканировании и (2) сбор данных MC1 с прицельной SIM в соответствии с вариантами реализации, описанными в настоящем документе. Показано, что прицельный сбор данных SIM MC1 обеспечивает возможность обнаружения частиц, представленных в меньшем количестве.

[0040] На **фиг. 2** представлено схематическое изображение иллюстративного протокола выбора регулируемого окна.

[0041] На **фиг. 3** представлены спектры MC1, записанные с помощью обычного сбора данных MC1 при полном сканировании (верхняя регистрограмма) или с помощью SIM сбора данных MC1 в соответствии с вариантами реализации, описанными в данном документе (нижняя регистрограмма).

[0042] На **фиг. 4** представлено схематическое изображение двух типов DDA MC2: (1) обычный DDA сбор данных MC2 и (2) сбор данных MC2 на платформе итеративного DDA в соответствии с вариантами реализации, описанными в данном документе.

[0043] На **фиг. 5** представлены результаты итеративного DDA MC2 для большего количества выбранных и фрагментированных частиц, по сравнению с обычным DDA MC2, в котором были выбраны и фрагментированы лишь частицы, представленные в большом количестве.

[0044] На **фиг. 6** представлено схематическое сравнение обычного способа определения характеристик образца и способа с применением комбинации SIM сбора данных в регулируемом окне и итеративного DDA MC2 в соответствии с вариантами реализации, описанными в данном документе.

[0045] На **фиг. 7** представлена таблица, демонстрирующая надежность и повышенную чувствительность SIM сбора данных в регулируемом окне по сравнению с MC при полном сканировании. По мере уменьшения концентрации соединения способность к обнаружению конкретной молекулы зависела от используемого способа. SIM сбор данных в регулируемом окне обеспечивала возможность обнаружения молекул в более низких концентрациях, чем MC при полном сканировании.

[0046] На **фиг. 8** представлен график, иллюстрирующий возможности итеративного DDA MC2. Верхняя линия представляет собой количество частиц в списке исключений масс-фильтра, а нижняя линия представляет собой количество частиц в списке включений масс-фильтра, каждое значение относительно повторного ввода пробы. Показано, что при увеличении номера повторного ввода пробы список исключений частиц увеличивается, а список включений уменьшается, что, в свою очередь, обеспечивает возможность фрагментации частиц, представленных в меньшем количестве, и обеспечивает надежный, высокочувствительный способ обнаружения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0047] Перед описанием настоящего изобретения следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, использованная в данном контексте, предназначена для описания лишь конкретных вариантов реализации, и она не является ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения ограничен лишь прилагаемой формулой изобретения. Любые варианты реализации или признаки вариантов реализации можно комбинировать друг с другом, и такие комбинации в явном виде входят в объем настоящего изобретения.

[0048] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в той области техники, к которой относится данное изобретение. В данном контексте термин «примерно», используемый в отношении конкретного упомянутого числового значения, означает, что данное значение может варьироваться от указанного значения не более чем на 1%. Например, в данном контексте выражение «примерно 100» включает 99 и 101, а также все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

[0049] В данном контексте термины «включают» «включает» и «включающий» являются неограничивающими, и их следует понимать как «содержат», «содержит» и «содержащий», соответственно.

[0050] Несмотря на то, что при практическом осуществлении или испытании настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, далее будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, в полном объеме включены в настоящий документ посредством ссылки.

Использованные сокращения

[0051] ACN: ацетонитрил

[0052] СНО: яичник китайского хомячка

[0053] CQA: критические показатели качества

[0054] CV: коэффициент вариации

- [0055] DDA: сбор данных в зависимости от полученных данных
- [0056] EIC: экстракционный ионный хроматограф
- [0057] ИЭР-МС: масс-спектрометрия с ионизацией в электроспрее
- [0058] FA: муравьиная кислота
- [0059] HC: тяжелая цепь
- [0060] HILIC: жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий
- [0061] BMM: высокая молекулярная масса
- [0062] IgG: иммуноглобулин G
- [0063] IPA: изопропанол
- [0064] LC: легкая цепь
- [0065] ЖХ-МС: жидкостная хроматомасс-спектрометрия
- [0066] HMM: низкая молекулярная масса
- [0067] mAb: моноклональное антитело
- [0068] MC: масс-спектрометрия
- [0069] MM: молекулярная масса
- [0070] M/Z: отношение массы к заряду
- [0071] NCE: нормализованная энергия соударений
- [0072] ФК: фармакокинетика
- [0073] PQA: показатель качества продукта
- [0074] ПТМ: посттрансляционная модификация
- [0075] ОФ-ЖХ: обращенно-фазовая жидкостная хроматография
- [0076] SIM: регистрация выбранных ионов

Определения

[0077] В данном контексте термин «белок» включает любой аминокислотный полимер, имеющий ковалентно связанные амидные связи. Белки содержат одну или более аминокислотных полимерных цепей, известных в данной области техники как «полипептиды». «Полипептид» относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, к родственным природным структурным вариантам и к их синтетическим аналогам, не встречающимся в природе, связанным пептидными связями, к родственным природным структурным вариантам и к их синтетическим аналогам, не встречающимся в природе. «Синтетические пептиды или полипептиды» относятся к пептиду или полипептиду, не встречающемуся в природе. Синтетические пептиды или полипептиды могут быть синтезированы, например, с помощью автоматического синтезатора полипептидов. Специалистам в данной области техники известны различные способы твердофазного синтеза пептидов. Белок может содержать один или несколько полипептидов, образуя единую функционирующую биомолекулу. Белок может включать любой из биотерапевтических белков, рекомбинантных белков, используемых в исследованиях или терапии, белков TRAP и других химерных белков слияния с рецептором Fc, химерных белков, антител, моноклональных антител, поликлональных антител, антител человека и биспецифических антител. В другом иллюстративном аспекте

белок может включать фрагменты антител, нанотела, химеры рекомбинантных антител, цитокины, хемокины, пептидные гормоны и т.п. Белки могут быть получены с помощью систем продуцирования на основе рекомбинантных клеток, таких как бакуловирусовая система в клетках насекомых, дрожжевые системы (например, виды *Pichia*), системы млекопитающих (например, клетки CHO и производные CHO, такие как клетки CHO-K1). Актуальный обзор, в котором рассмотрены биотерапевтические белки и их получение, представлен в публикации Ghaderi et al., "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation" (Biotechnol. Genet. Eng. Rev. (2012) 147-75). В некоторых вариантах реализации белки содержат модификации, аддукты и другие ковалентно связанные фрагменты. Такие модификации, аддукты и фрагменты включают, например, авидин, стрептавидин, биотин, гликаны (например, N-ацетилгалактозамин, галактоза, нейраминовая кислота, N-ацетилглюкозамин, фукоза, манноза и другие моносахариды), ПЭГ, полигистидин, FLAG-маркер, мальтоза-связывающий белок (MBP), хитин-связывающий белок (CBP), мус-эпитоп глутатион-S-трансферазы (GST), флуоресцентные метки и другие красители, и т.п. Белки можно классифицировать по составу и растворимости и, таким образом, они могут включать простые белки, такие как глобулярные белки и волокнистые белки; конъюгированные белки, такие как нуклеопроотеины, гликопротеины, мукопротеины, хромопротеины, фосфопротеины, металлопротеины и липопротеины; и дериваты белка, такие как первичные дериваты белка и вторичные дериваты белка.

[0078] «Вариантный белок» или «белковый вариант», или «вариант» в данном контексте может включать белок, который отличается от белка-мишени по меньшей мере одной аминокислотной модификацией. Белковый вариант может относиться к самому белку, к композиции, содержащей белок, или к аминокислотной последовательности, которая его кодирует. Предпочтительно, белковый вариант имеет по меньшей мере одну аминокислотную модификацию по сравнению с исходным белком, например, от примерно одной до примерно десяти аминокислотных модификаций и предпочтительно от примерно одной до примерно пяти аминокислотных модификаций по сравнению с исходным белком. Последовательность белкового варианта в данном контексте предпочтительно имеет по меньшей мере примерно 80% гомологию с последовательностью исходного белка и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 90% гомологию, более предпочтительно по меньшей мере примерно 95% гомологию. В некоторых иллюстративных вариантах реализации белок может представлять собой антитело, биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело или их комбинации.

[0079] Термин «антитело» в данном контексте относится к молекулам иммуноглобулина, состоящим из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных друг с другом дисульфидными связями (т.е. «молекулам полных антител»), а также к их мультимерам (например, IgM) или их антигенсвязывающим фрагментам. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области

тяжелой цепи («HCVR» или «V_H») и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}). В различных вариантах реализации тяжелая цепь может представлять собой изотип IgG. В некоторых случаях тяжелая цепь выбрана из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах реализации тяжелая цепь относится к изотипу IgG1 или IgG4 и необязательно содержит химерную шарнирную область изотипа IgG1/IgG2 или IgG4/IgG2. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи («LCVR» или «V_L») и константной области легкой цепи (C_L). Области V_H и V_L можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежаемые областями, которые являются более консервативными, называемыми 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, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает молекулы антител, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как антитела, выделенные из клетки хозяина, трансфицированной для экспрессии данного антитела. Обзор структуры антител представлен в публикациях Lefranc et al., *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, 27(1) *Dev. Comp. Immunol.* 55-77 (2003); и M. Potter, *Structural correlates of immunoglobulin diversity*, 2(1) *Surv. Immunol. Res.* 27-42 (1983).

[0080] Термин «антитело» также включает «биспецифическое антитело», которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним различным эпитопом. Одна половина биспецифического антитела, которая содержит одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, а также шесть CDR, связывается с одним антигеном или эпитопом, а другая половина антитела связывается с другим антигеном или эпитопом. В некоторых случаях биспецифическое антитело может связываться с одним и тем же антигеном, но у разных эпитопов или неперекрывающихся эпитопов. В некоторых случаях обе половины биспецифического антитела имеют одинаковые легкие цепи, но при этом сохраняют двойную специфичность. Биспецифические антитела описаны, в целом, в публикации заявки на патент США № 2010/0331527 (30 декабря, 2010).

[0081] Термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или «фрагмент антитела») относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающая часть», включают (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al.

(1989) *Nature* 241:544-546), который состоит из домена VH, (vi) выделенную CDR и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, связанных синтетическим линкером с образованием одной белковой цепи, в которой указанные области VL и VH спарены с образованием одновалентных молекул. Другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела, также включены в термин «антитело» (см., например, Holliger et al. (1993) 90 PNAS U.S.A. 6444-6448; и Poljak et al. (1994) 2 Structure 1121-1123).

[0082] Кроме того, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с помощью стандартных технологий рекомбинантных ДНК, общеизвестных в данной области техники (см. Sambrook et al., 1989). В данной области техники известны также способы генерации антител человека у трансгенных мышей. Например, с помощью технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа генерации моноклональных антител сначала выделяют химерные антитела с высокой аффинностью к требуемому антигену, имеющие переменную область человека и константную область мыши. Технология VELOCIMMUNE® включает создание трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий переменные области тяжелой и легкой цепей человека, функционально связанные с эндогенными локусами константной области мыши, так что указанная мышь в ответ на антигенную стимуляцию вырабатывает антитело, содержащее переменную область человека и константную область мыши. ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой цепей антитела, выделяют и функционально связывают с ДНК, кодирующей константные области тяжелой и легкой цепей человека. Затем экспрессируют ДНК в клетке, способной экспрессировать полное антитело человека.

[0083] Термин «антитело человека» включает антитела, имеющие переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человека зародышевой линии. mAb человека согласно настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человека зародышевой линии (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или в результате соматической мутации *in vivo*), например, в CDR и, в частности, CDR3. Однако термин «антитело человека» в данном контексте не включает mAb, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих (например, мышей), привиты на последовательности FR человека. Данный термин включает антитела, рекомбинантно выработанные у млекопитающего, не являющегося человеком, или в клетках млекопитающего, не являющегося человеком. Данный термин не включает антитела, выделенные или выработанные субъектом, который является человеком.

[0084] В данном контексте термин «субъект» относится к животному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно человеку, например, нуждающемуся в облегчении, предотвращении и/или лечении заболевания или расстройства.

[0085] В данном контексте термин «примесь» может включать любой нежелательный белок, присутствующий в биофармацевтическом продукте. Примесь может включать примеси, связанные с технологическим процессом и продуктом. Кроме того, примесь может иметь известную структуру, быть частично охарактеризованной или неидентифицированной. Примеси, связанные с технологическим процессом, могут быть обусловлены процессом производства и могут включать три основные категории: внесенные из клеточного субстрата, внесенные из клеточной культуры и внесенные в дальнейшем. Примеси, внесенные из клеточного субстрата, включают, но не ограничиваясь ими, белки, полученные из организма и нуклеиновой кислоты хозяина (геномная, векторная или общая ДНК клетки хозяина). Примеси, внесенные из клеточной культуры, включают, но не ограничиваясь ими, инициаторы, антибиотики, сыворотку и другие компоненты среды. Примеси, внесенные в дальнейшем, включают, но не ограничиваясь ими, ферменты, химические и биохимические технологические реагенты (например, бромистый циан, гуанидин, окислительные и восстановительные агенты), неорганические соли (например, тяжелые металлы, мышьяк, ионы неметаллов), растворители, носители, лиганды (например, моноклональные антитела) и другие выщелачиваемые вещества. Примеси, связанные с продуктом (например, прекурсоры, некоторые продукты разложения), могут представлять собой молекулярные варианты, возникающие при производстве и/или хранении, которые не обладают свойствами, сравнимыми со свойствами требуемого продукта в отношении активности, эффективности и безопасности. Такие варианты могут потребовать значительных усилий для выделения и определения характеристик с целью идентификации типа модификации(й). Примеси, связанные с продуктом, могут включать усеченные формы, модифицированные формы и агрегаты. Усеченные формы образуются под действием гидролитических ферментов или химических веществ, которые катализируют расщепление пептидных связей. Модифицированные формы включают, но не ограничиваясь ими, дезамидированные, изомеризованные, ошибочно S-S связанные, окисленные или видоизмененные конъюгированные формы (например, гликозилирование, фосфорилирование). Модифицированные формы также могут включать любую форму посттрансляционной модификации. Агрегаты включают димеры и мультимеры требуемого продукта (Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH, август, 1999, Департамент здравоохранения и социальных служб США).

[0086] Термин «низкомолекулярная (НММ) белковая примесь в лекарственном средстве» включает, но не ограничиваясь ими, прекурсоры, продукты разложения, усеченные частицы, протеолитические фрагменты, включая фрагменты Fab, фрагменты Fc или тяжелых цепей, фрагменты лигандов или рецепторов, частицы H2L (2 тяжелые цепи и 1 легкая цепь), H2 (2 тяжелые цепи), HL (1 тяжелая цепь и 1 легкая цепь), HC (1 тяжелая цепь) и LC (1 легкая цепь). НММ белковая примесь в лекарственном средстве может представлять собой любой вариант, который является неполной версией белкового продукта, такой как один или более компонентов мультимерного белка. Белковая примесь

в лекарственном средстве, примесь в лекарственном средстве или примесь в продукте являются терминами, которые в данном описании могут быть использованы взаимозаменяемо. НММ примеси в лекарственном средстве или продукте, в целом, рассматривают как молекулярные варианты с такими свойствами как активность, эффективность и безопасность, которые могут отличаться от соответствующих свойств требуемого лекарственного продукта.

[0087] Разложение белкового продукта является проблемой при производстве белкового лекарственного продукта в системах клеточных культур. Например, может возникать протеолиз белкового продукта вследствие высвобождения протеаз в среде для культивирования клеток. Для предотвращения разложения в клеточную культуру вводят добавки к питательной среде, такие как растворимые источники железа, добавляемые для ингибирования металлопротеаз, или ингибиторы серин- и цистеинпротеаз (Clincke, M.-F., et al, BMC Proc. 2011, 5, с. 115). С-концевые фрагменты могут расщепляться во время производства под действием карбоксилпептидаз, присутствующих в клеточной культуре (Dick, LW et al, Biotechnol Bioeng 2008; 100:1132-43).

[0088] Термин «высокомолекулярная (ВММ) белковая примесь в лекарственном средстве» включает, но не ограничиваясь ими, тримеры mAb и димеры mAb. ВММ частицы можно разделить на две группы: 1) мономер с дополнительными легкими цепями (частицы H2L3 и H2L4) и 2) комплексы мономера с фрагментами Fab. Кроме того, после ферментативного расщепления вследствие обработки IdeS образуются различные димеризованные фрагменты Fab2-Fab2, Fc-Fc и Fab2-Fc).

[0089] «Посттрансляционная модификация» (ПТМ) относится к ковалентной модификации белков после биосинтеза белков. Посттрансляционные модификации могут происходить на боковых цепях аминокислот или на С- или N-концах белка. ПТМ обычно осуществляют с помощью специальных ферментов или ферментативных путей. Многие из них встречаются по месту нахождения специфической характеристической последовательности белка (например, сигнатурной последовательности) в скелете белка. Описаны несколько сотен ПТМ, и такие модификации всегда влияют на некоторые аспекты структуры или функции белка (Walsh, G. "Proteins" (2014), второе издание, опубликовано компанией Wiley and Sons, Ltd., ISBN: 9780470669853). Различные посттрансляционные модификации включают, но не ограничиваясь ими, расщепление, N-концевые удлинения, разложение белка, ацилирование N-конца, биотинилирование (ацилирование лизиновых остатков биотином), амидирование С-конца, гликозилирование, иодирование, ковалентное присоединение простетических групп, ацетилирование (присоединение ацетильной группы, обычно на N-конце белка), алкилирование (присоединение алкильной группы (например, метила, этила, пропила), обычно по лизиновым или аргининовым остаткам), метилирование, аденилирование, АДФ-рибозилирование, ковалентные поперечные связи внутри полипептидных цепей или между ними, сульфонирование, пренилирование, зависимые от витамина С модификации (гидроксилирование пролина и лизина и амидирование карбокси-конца), зависимые от

витамина К модификации, в которых витамин К является кофактором для карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты, приводящего к образованию γ -карбоксиглутамата (остатка Glu), глутамилирование (ковалентное связывание остатков глутаминовой кислоты), глицилирование (ковалентное связывание остатков глицина), гликозилирование (присоединение гликозильной группы к аспарагину, гидроксизину, серину или треонину с образованием гликопротеина), изопренилирование (присоединение изопреноидной группы, такой как фарнезол и геранилгераниол), липоилирование (присоединение липоатной функциональной группы), фосфопантетеинилирование (присоединение 4'-фосфопантетеинильного фрагмента от кофермента А, как при биосинтезе жирной кислоты, поликетидов, нерибосомного пептида и лейцина), фосфорилирование (присоединение фосфатной группы, обычно к серину, тирозину, треонину или гистидину) и сульфатирование (присоединение сульфатной группы, обычно к тирозиновому остатку). Посттрансляционные модификации, которые изменяют химическую природу аминокислот, включают, но не ограничиваясь ими, цитруллинирование (например, превращение аргинина в цитруллин посредством дезиминирования) и дезамидирование (например, превращение глутамина в глутаминовую кислоту или аспарагина в аспарагиновую кислоту). Посттрансляционные модификации, которые затрагивают структурные изменения, включают, но не ограничиваясь ими, образование дисульфидных мостиков (ковалентных связей двух цистеиновых аминокислот) и протеолитическое расщепление (расщепление белка по пептидной связи). Некоторые посттрансляционные модификации включают присоединение других белков или пептидов, такие как ISG-илирование (ковалентное связывание с белком ISG15 (ген, стимулируемый интерфероном)), SUMO-илирование (ковалентное связывание с белком SUMO (малый убиквитин-подобный модификатор)) и убиквитинирование (ковалентное связывание с белком убиквитином). См. www.uniprot.org/docs/ptmlist, где представлен более подробный нормативный словарь ПТМ, составленный UniProt.

[0090] Термин «гликопептид/гликопротеин» в данном контексте представляет собой пептид/белок, модифицированный во время или после его синтеза посредством ковалентно связанных углеводов или гликанов. В некоторых вариантах реализации гликопептид получен из моноклонального антитела, например, в результате протеазного расщепления моноклонального антитела.

[0091] В данном контексте термин «гликан» представляет собой соединение, содержащее одно или более сахарных звеньев, которые обычно включают глюкозу (Glc), галактозу (Gal), маннозу (Man), фукозу (Fuc), N-ацетилгалактозамин (GalNAc), N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилнейраминную кислоту (NeuNAc) (Frank Kjeldsen, et al. Anal. Chem. 2003, 75, 2355-2361). Гликановый фрагмент в гликопротеине, таком как моноклональное антитело, является важным элементом для определения его функции или положения в клетке. Например, специфическое моноклональное антитело модифицировано специфическим гликановым фрагментом.

[0092] Термин «образец» в данном контексте относится к смеси молекул, таких как компоненты среды для культивирования клеток, с которой осуществляют манипуляции в соответствии со способами настоящего изобретения, включая, например, разделение, анализ или профилирование. Образец может содержать по меньшей мере молекулу аналита, например, гликопептида, например, полученного из моноклонального антитела, с которой осуществляют манипуляции в соответствии со способами настоящего изобретения, включая, например, разделение, анализ, экстракцию, концентрирование или профилирование.

[0093] Термины «анализ» или «проведение анализа» в данном контексте использованы взаимозаменяемо и относятся к любому из различных методов разделения, обнаружения, выделения, очистки, солублизации, выявления и/или определения характеристик рассматриваемых молекул. Примеры включают, но не ограничиваясь ими, твердофазную экстракцию, твердофазную микроэкстракцию, электрофорез, масс-спектрометрию, например, МС с мультиплексной прицельной регистрацией выбранных ионов (SIM) с последующим итеративным DDA МС2, ИЭР-МС, SPE HILIC (жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий с твердофазной экстракцией) или MALDI-МС (масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), жидкостную хроматографию, например, высокоэффективную, например, обращенно-фазовую, нормально-фазовую или эксклюзионную, ион-парную жидкостную хроматографию, жидкость-жидкостную экстракцию, например, ускоренную жидкостную экстракцию, сверхкритическую жидкостную экстракцию, микроволновую экстракцию, мембранную экстракцию, экстракцию в аппарате Сокслета, осаждение, осветление, электрохимическое обнаружение, окрашивание, элементный анализ, расщепление по Эдману, ядерный магнитный резонанс, инфракрасный анализ, анализ с вводом пробы в поток, капиллярную электрохроматографию, ультрафиолетовое обнаружение и их комбинации.

[0094] Термин «профилирование» в данном контексте относится к любому из различных методов анализа, которые используют в комбинации для определения содержания, состава или характерного соотношения соединений, таких как белки.

[0095] «Приведение в контакт» в данном контексте включает сближение по меньшей мере двух веществ в растворе или твердой фазе.

[0096] «Анализ пептидного картирования» в данном контексте включает эксперименты, в которых белок подвергают расщеплению с последующим разделением полученных пептидов и их анализом, предпочтительно с помощью ЖХ-МС. В некоторых иллюстративных вариантах реализации анализ пептидного картирования может быть использован для подтверждения первичной последовательности белковых биофармацевтических препаратов, при этом белковую молекулу можно сначала гидролизовать на небольшие пептидные фрагменты с помощью гидролизующего агента, а затем определяют аминокислотную последовательность каждого пептидного фрагмента анализом ЖХ-МС с учетом предполагаемой последовательности кДНК и специфичности

используемой протеазы. Данные, полученные анализом пептидного картирования, также могут быть использованы для идентификации и количественного определения посттрансляционных модификаций, подтверждения дисульфидных связей и даже для обнаружения событий аминокислотных замещений, присутствующих в очень низких концентрациях ($<0,1\%$) (Zeck et al. PloS one 2012, 7, e40328). Во время анализа пептидного картирования белковых биофармацевтических препаратов ЖХ-МС часто можно проводить в комбинации с ультрафиолетовым (УФ) обнаружением с получением так называемых УФ отпечатков, которые можно использовать отдельно в качестве анализа подлинности во время контроля качества (КК) и высвобождения лекарственного соединения.

[0097] В данном контексте термин «расщепление» относится к гидролизу одной или более пептидных связей белка. Существует несколько подходов к осуществлению расщепления белка в образце с использованием соответствующего гидролизующего агента, например, ферментативного расщепления или неферментативного расщепления. В данном контексте термин «гидролизующий агент» относится к любому одному агенту или к комбинации большого количества 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 наружной мембраны T (OmpT), иммуноглобулин-расщепляющий фермент гноеродных бактерий *Streptococcus* (IdeS), химотрипсин, пепсин, термолизин, папаин, проназу и протеазу из *Aspergillus Saitoi*. Неограничивающие примеры гидролизующих агентов, которые могут осуществлять неферментативное расщепление, включают применение высокой температуры, микроволн, ультразвука, высокого давления, инфракрасного излучения, растворителей (неограничивающими примерами являются этанол и ацетонитрил), расщепление на иммобилизованном ферменте (IMER), применение ферментов, иммобилизованных на магнитных частицах, и ферментов, иммобилизованных на чипах. Актуальный обзор, в котором рассмотрены доступные технологии расщепления белков, представлен в публикации Switazar et al., “Protein Digestion: An Overview of the Available Techniques and Recent Developments” (J. Proteome Research 2013, 12, 1067-1077). Один гидролизующий агент или комбинация гидролизующих агентов может расщеплять пептидные связи в белке или полипептиде последовательность-специфическим образом с образованием предсказуемого набора более коротких пептидов.

[0098] Доступны несколько подходов, которые могут быть использованы для расщепления белка. Один из широко распространенных способов расщепления белков в образце включает использование протеаз. Существует множество протеаз, и каждая из них имеет собственные характеристики с точки зрения специфичности, эффективности и оптимальных условий расщепления. Протеазы относятся как к эндопептидазам, так и к экзопептидазам, в соответствии с классификацией по способности протеаз к расщеплению у неконцевых или концевых аминокислот в пептиде. Альтернативно, протеазы также

относятся к шести отдельным классам - аспарагиновые, глутаминовые и металлопротеазы, цистеиновые, сериновые и треониновые протеазы, в соответствии с классификацией по механизму катализа. Термины «протеаза» и «пептидаза» использованы взаимозаменяемо и относятся к ферментам, которые гидролизуют пептидные связи. Протеазы также можно классифицировать на специфические и неспецифические протеазы. В данном контексте термин «специфическая протеаза» относится к протеазе со способностью расщеплять пептидный субстрат в определенной боковой цепи аминокислоты пептида. В данном контексте термин «неспецифическая протеаза» относится к протеазе со сниженной способностью расщеплять пептидный субстрат в определенной боковой цепи аминокислоты пептида. Предпочтительность расщепления может быть определена по отношению количества конкретной аминокислоты в качестве сайта расщепления к общему количеству расщепленных аминокислот в последовательностях белка.

[0099] Белок может быть необязательно получен до определения характеристик. В некоторых иллюстративных вариантах реализации получение белка включает стадию расщепления белка. В некоторых конкретных иллюстративных вариантах реализации получение белка включает стадию расщепления белка, причем расщепление белка может быть выполнено с помощью трипсина.

[00100] В некоторых иллюстративных вариантах реализации получение белка может включать стадию денатурации белка, восстановления белка, буферизации белка и/или обессоливания образца до стадии расщепления белка. Указанные стадии могут быть выполнены любым подходящим образом, произвольно.

[00101] Для определения характеристик различных признаков белка с помощью анализа пептидного картирования или анализа массы исходного вещества можно осуществлять многочисленные анализы на основе ЖХ-МС.

[00102] В данном контексте термин «жидкостная хроматография» относится к способу, в котором химическая смесь, переносимая жидкостью, может быть разделена на компоненты вследствие различного распределения химических веществ по мере их движения вокруг или над неподвижной жидкой или твердой фазой. Неограничивающие примеры жидкостной хроматографии включают обращенно-фазовую жидкостную хроматографию, ионообменную хроматографию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию и гидрофобную хроматографию.

[00103] В данном контексте термин «масс-спектрометр» относится к устройству, выполненному с возможностью обнаружения определенных молекулярных частиц и точного измерения их масс. Данный термин может включать любой молекулярный детектор, в который можно элюировать полипептид или пептид для обнаружения и/или определения характеристик. Масс-спектрометр состоит из трех основных частей: источника ионов, масс-анализатора и детектора. Роль источника ионов заключается в создании ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры аналита могут переходить в газовую фазу и одновременно ионизироваться (как при ионизации в электроспрее). Выбор источника ионов зависит от применения.

[00104] В данном контексте «масс-анализатор» относится к устройству, которое выполнено с возможностью разделения частиц, то есть атомов, молекул или кластеров в соответствии с их массой. Неограничивающие примеры масс-анализаторов, которые могут быть использованы, представляют собой времяпролетный (TOF) анализатор, магнитно/электрический секторный анализатор, квадрупольный масс-фильтр (Q), квадрупольную ионную ловушку (QIT), орбитрэп, ионный циклотронный резонанс с преобразованием Фурье (FTICR), а также технологию ускорительной масс-спектрометрии (AMS).

[00105] В данном контексте «отношение массы к заряду» или « m/z » использовано для обозначения безразмерного количества, полученного делением массы иона в унифицированных атомных единицах массы на значение его заряда (независимо от знака). В целом, степень заряженности зависит от: способа ионизации (поскольку ионизация в электроспрее, ИЭР обычно способствует многократной ионизации, которая не столь часто происходит при MALDI), длины пептида (поскольку более длинные пептиды содержат больше групп, к которым могут быть присоединены дополнительные протоны (основные остатки)), последовательности пептида (поскольку некоторые аминокислоты (например, Arg или Lys) более восприимчивы к ионизации, чем другие), настроек прибора, pH растворителя и состава растворителя.

[00106] В данном контексте термин «тандемная масс-спектрометрия» относится к технологии, в которой структурная информация о молекулах образца может быть получена с использованием нескольких ступеней отбора по массам и разделения по массам. Необходимым условием является возможность переноса молекул образца в газовую фазу и их ионизации в неизменном виде, а также возможность инициации их распада неким предсказуемым и контролируемым образом после первой стадии отбора по массам. Многоступенчатая MC/MC или MC_n может быть осуществлена посредством первоначального отбора и выделения иона-предшественника (MC₂), его фрагментации, выделения иона первичного фрагмента (MC₃), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (MC₄) и так далее до тех пор, пока существует возможность получения значимой информации или обнаружения сигнала фрагментарного иона. Тандемную MC успешно проводят, используя многочисленные комбинации анализаторов. То, какие анализаторы следует комбинировать для конкретной задачи, можно определить на основании многих различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Две основные категории методом тандемной MC представляют собой тандем в пространстве и тандем во времени, но существуют также другие гибриды, в которых тандемные во времени анализаторы соединены в пространстве или с анализаторами, тандемными в пространстве.

[00107] Тандемный в пространстве масс-спектрометр содержит источник ионов, устройство для активации ионов-предшественников и по меньшей мере два масс-анализатора без ловушек. Конкретные функции разделения m/z могут быть спланированы таким образом, чтобы отбор ионов происходил в одной секции прибора, в средней части

происходила их диссоциация, а затем полученные ионы переходили в другой анализатор для разделения m/z и сбора данных.

[00108] В масс-спектрометре, тандемном во времени, ионы, полученные в источнике ионов, можно улавливать, выделять, фрагментировать и разделять по m/z в одном физическом устройстве.

[00109] «Прицельная масс-спектрометрия» в данном контексте представляет собой технологию масс-спектрометрии, в которой используют несколько ступеней тандемной масс-спектрометрии (МС_n с $n=2$ или 3) для ионов определенной массы (m/z) в определенное время. Значения m/z и времени определены в списке включений, который был получен на основании предыдущего анализа.

[00110] В данном контексте термин «гибридный квадрупольный масс-спектрометр с ловушкой орбитрэп» относится к гибридной системе, полученной при подключении квадрупольного масс-спектрометра к масс-анализатору орбитрэп. Эксперимент, тандемный во времени, с использованием гибридного квадрупольного масс-спектрометра с ловушкой орбитрэп начинают с эжекции из квадрупольного масс-спектрометра всех ионов, кроме тех, которые находятся в пределах выбранного, узкого диапазона m/z . Отобранные ионы можно вводить в орбитрэп и фрагментировать, чаще всего посредством низкоэнергетической CID (диссоциации, индуцированной столкновениями). Фрагменты в диапазоне приемлемых значений m/z ловушки должны оставаться в ловушке, и может быть записан спектр МС-МС. Для быстрого секвенирования белков могут быть использованы аналогичные гибридные системы, такие как, но не ограничиваясь ими, QIT-FTICR и Qq-FTICR.

[00111] В данном контексте термин «секвенирование белка de novo» относится к процедуре определения аминокислотной последовательности пептида, не опираясь на информацию, полученную из других источников. Благодаря высокой степени чувствительности масс-спектрометрии, такая технология может обеспечивать важнейшую информацию, что часто находится за пределами возможностей обычных методов секвенирования.

[00112] В данном контексте термин «покрытие последовательности белка» относится к проценту последовательности белка, охваченной идентифицированными пептидами. Процентное покрытие можно рассчитать делением количества аминокислот во всех найденных пептидах на общее количество аминокислот во всей последовательности белка.

[00113] В данном контексте термин «база данных» относится к биоинформационным инструментам, которые обеспечивают возможность поиска неинтерпретированных спектров МС-МС по всем возможным последовательностям в базе(ах) данных. Неограничивающими примерами таких инструментов являются Mascot (www.matrixscience.com), Spectrum Mill (www.chem.agilent.com), PLGS (www.waters.com), PEAKS (www.bioinformaticssolutions.com), Proteinpilot (download.appliedbiosystems.com/proteinpilot), Phenyx (www.phenyx-

ms.com), Sorcerer (www.sagenresearch.com), OMSSA (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/), X!Tandem (www.thegpm.org/TANDEM/), Protein Prospector (www.prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm), Byonic (www.proteinmetrics.com/products/byonic) или Sequest (fields.scripps.edu/sequest).

Общее описание

[00114] На основании вышеизложенного понятно, что существует потребность в усовершенствованных способах и системах для улучшения обнаружения и определения характеристик соединений. Описанное изобретение удовлетворяет указанную потребность. В настоящем документе описаны способы высокодостоверной идентификации соединений методом жидкостной хроматомасс-спектрометрии (ЖХ-МС), например, для усовершенствования технологий получения антител. В вариантах реализации, описанных в настоящем документе, предложены способы надежного, высокочувствительного определения характеристик образца посредством комбинирования мультиплексных прицельных SIM и итеративного сбора данных DDA MS2.

[00115] В некоторых иллюстративных вариантах реализации предложенный способ включает подачу образца в систему жидкостной хроматографии, выполненную с возможностью разделения образца с получением компонентов образца; анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) с получением списка включений; и выполнение итеративного сбора данных в зависимости от данных масс-спектра (DDA) из списка включений для идентификации отдельных компонентов образца, что обеспечивает определение характеристик образца.

[00116] В некоторых вариантах реализации подача образца в систему жидкостной хроматографии, выполненную с возможностью разделения образца с получением компонентов образца, включает подачу образца в систему обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФЖХ), систему ионообменной хроматографии, систему эксклюзионной хроматографии, систему аффинной хроматографии, систему хроматографии гидрофильных взаимодействий или систему гидрофобной хроматографии.

[00117] В некоторых вариантах реализации система жидкостной хроматографии представляет собой систему ОФЖХ. В некоторых конкретных вариантах реализации анализ ОФЖХ осуществляют с использованием колонки Supelco Discovery HS F5-3. Температуру колонки можно поддерживать при постоянном значении в течение всего времени записи хроматограммы, например, с помощью промышленного нагревателя колонки. В некоторых вариантах реализации колонку поддерживают при температуре от примерно 18 °C до примерно 70 °C, например, от примерно 30 °C до примерно 60 °C, от примерно 40 °C до примерно 50 °C, например, при примерно 20 °C, примерно 25 °C, примерно 30 °C, примерно 35 °C, примерно 40 °C, примерно 45 °C, примерно 50 °C, примерно 55 °C, примерно 60 °C, примерно 65 °C или примерно 70 °C. В некоторых вариантах реализации температура колонки составляет примерно 40 °C. В некоторых вариантах реализации время записи хроматограммы может составлять от примерно 15 до

примерно 240 минут, например, от примерно 20 до примерно 70 минут, от примерно 30 до примерно 60 минут, от примерно 40 до примерно 90 минут, от примерно 50 минут до примерно 100 минут, от примерно 60 до примерно 120 минут, от примерно 50 до примерно 80 минут.

[00118] В некоторых вариантах реализации подвижная фаза представляет собой водную подвижную фазу. Иллюстративная водная подвижная фаза содержит 140 мМ ацетата натрия и 10 мМ бикарбоната аммония. УФ регистрируемые обычно записывают при 215 и 280 нм.

[00119] В некоторых иллюстративных вариантах реализации подвижная фаза, используемая для элюирования белка, может представлять собой подвижную фазу, которая может быть совместима с масс-спектрометром.

[00120] В некоторых иллюстративных вариантах реализации подвижная фаза, используемая в устройстве жидкостной хроматографии, может включать воду, ацетонитрил, трифторуксусную кислоту, муравьиную кислоту или их комбинацию.

[00121] В некоторых иллюстративных вариантах реализации подвижная фаза может иметь скорость потока от примерно 0,1 мл/мин до примерно 0,4 мл/мин в устройстве жидкостной хроматографии. В одном аспекте скорость потока подвижной фазы в устройстве жидкостной хроматографии может составлять примерно 0,1 мл/мин, примерно 0,15 мл/мин, примерно 0,20 мл/мин, примерно 0,25 мл/мин, примерно 0,30 мл/мин, примерно 0,35 мл/мин или примерно 0,4 мл/мин.

[00122] В некоторых вариантах реализации анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает использование ионной ловушки или масс-анализатора орбитрэп. В некоторых вариантах реализации ионная ловушка или масс-анализатор орбитрэп представляет собой масс-спектрометр Thermo Q Exactive HF Orbitrap.

[00123] В некоторых вариантах реализации анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает сегментирование настроек окна отношений массы к заряду, в который включены несколько сегментов, и каждый сегмент имеет несколько окон. В некоторых вариантах реализации используют по меньшей мере два, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или более сегментов. В некоторых вариантах реализации используют три сегмента. В некоторых вариантах реализации используют четыре сегмента.

[00124] В некоторых вариантах реализации каждый сегмент содержит несколько окон одинаковой ширины. В некоторых вариантах реализации используют по меньшей мере 2 или более окон, например, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10 окон. В некоторых вариантах реализации каждый сегмент содержит 10 окон.

[00125] В некоторых вариантах реализации ширина окон является различной для нескольких сегментов. Например, ширина окон в диапазонах m/z , представляющих собой наибольший интерес, меньше, чем ширина окон, представляющих собой меньший интерес. В некоторых вариантах реализации сегменты один и два имеют ширину окон меньше ширины окон сегментов три и четыре. Например, как показано на фиг. 2, иллюстративная группировка может содержать четыре сегмента в диапазоне от m/z 60 до 760,5: сегмент 1, от m/z 60 до m/z 155,5 с шириной окна 10 Да; сегмент 2, от m/z 155 до m/z 250,5, ширина окна 10 Да; сегмент 3, от m/z 250 до m/z 505,5, ширина окна 25 Да; и сегмент 4, от m/z 505,5 до m/z 760,5, ширина окна 25 Да, причем каждый сегмент содержит 10 окон, и перекрытие между смежными окнами составляет 0,5 Да.

[00126] В различных вариантах реализации после получения списка включений предложенный способ включает выполнение итеративного DDA MS2 из списка включений для идентификации отдельных компонентов образца, что обеспечивает определение характеристик образца.

[00127] В некоторых иллюстративных вариантах реализации для итеративного DDA MS используют ионную ловушку или масс-анализатор орбитрэп, оснащенный сегментированным квадрупольным масс-фильтром.

[00128] В некоторых иллюстративных вариантах реализации для итеративного DDA MS используют доступную в продаже ионную ловушку или масс-анализатор орбитрэп, оснащенный сегментированным квадрупольным масс-фильтром, такой как масс-спектрометр Thermo Orbitrap™ Fusion Lumos.

[00129] В некоторых иллюстративных вариантах реализации после итеративного DDA MS осуществляют обработку данных, например, с помощью

[00130] В некоторых вариантах реализации образец представляет собой среду для культивирования клеток, такую как среда для культивирования клеток, используемая для периодической подпитки клеточной культуры, непрерывного культивирования клеток или культивирования клеток с орошением.

[00131] В некоторых вариантах реализации образец среды для культивирования клеток представляет собой среду на основе сои для культивирования клеток.

[00132] В некоторых иллюстративных вариантах реализации среда для культивирования клеток предназначена для системы продуцирования на основе рекомбинантных клеток, такой как система млекопитающего. В некоторых вариантах реализации

[00133] В некоторых вариантах реализации предложенный способ предназначен для описания характеристик компонентов и их метаболитов в среде для культивирования клеток до или после инкубации в производственной системе на основе рекомбинантных клеток. В некоторых вариантах реализации система продуцирования на основе рекомбинантных клеток предназначена для продуцирования белка. Примеры белков включают, но не ограничиваясь ими, антитело, белок слияния, рекомбинантный белок или их комбинация.

[00134] В некоторых вариантах реализации антитело представляет собой биспецифическое антитело, фрагмент антитела или мультиспецифическое антитело.

[00135] В некоторых иллюстративных вариантах реализации антитело представляет собой моноклональное антитело, такое как, но не ограничиваясь ими, моноклональное антитело изотипа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или смешанного изотипа.

[00136] В некоторых иллюстративных вариантах реализации белок представляет собой терапевтический белок.

[00137] В некоторых иллюстративных вариантах реализации белок может представлять собой белок иммуноглобулина.

[00138] В одном иллюстративном варианте реализации белок может представлять собой белковый вариант.

[00139] В одном иллюстративном варианте реализации белок может представлять собой белок с посттрансляционной модификацией.

[00140] В одном иллюстративном варианте реализации белок с посттрансляционной модификацией может быть получен посредством расщепления, N-концевых удлинений, разложения белка, ацилирования N-конца, биотинилирования, амидирования C-конца, окисления, гликозилирования, иодирования, ковалентного присоединения простетических групп, ацетилирования, алкилирования, метилирования, аденилирования, АДФ-рибозилирования, ковалентных поперечных связей внутри полипептидных цепей или между ними, сульфонирования, пренилирования, зависимых от витамина С модификаций, зависимых от витамина К модификаций, глутамилирования, глицилирования, гликозилирования, дегликозилирования, изопренилирования, липоилирования, фосфопантетеинилирования, фосфорилирования, сульфатирования, цитруллинирования, дезамидирования, образования дисульфидных мостиков, протеолитического расщепления, ISG-илирования, SUMO-илирования или убиквитинирования (ковалентного связывания с белком убиквитином).

[00141] В одном иллюстративном варианте реализации белок с посттрансляционной модификацией может быть получен окислением белка.

[00142] В другом иллюстративном варианте реализации среда для культивирования клеток может содержать продукт разложения, такой как посттрансляционная модификация терапевтического белка.

[00143] В некоторых иллюстративных вариантах реализации белок может представлять собой белок с pI от примерно 4,5 до примерно 9,0. В одном аспекте белок может представлять собой белок с pI примерно 4,5, примерно 5,0, примерно 5,5, примерно 5,6, примерно 5,7, примерно 5,8, примерно 5,9, примерно 6,0, примерно 6,1, примерно 6,2, примерно 6,3, примерно 6,4, примерно 6,5, примерно 6,6, примерно 6,7, примерно 6,8, примерно 6,9, примерно 7,0, примерно 7,1, примерно 7,2, примерно 7,3, примерно 7,4, примерно 7,5, примерно 7,6, примерно 7,7, примерно 7,8, примерно 7,9, примерно 8,0, примерно 8,1, примерно 8,2, примерно 8,3, примерно 8,4, примерно 8,5, примерно 8,6, примерно 8,7, примерно 8,8, примерно 8,9 или примерно 9,0.

[00144] В некоторых вариантах реализации идентифицированные компоненты включают, но не ограничиваясь ими, аминокислоты, дипептиды, трипептиды или их комбинации с динамическим диапазоном содержания по меньшей мере 2 порядка величин, например, по меньшей мере 3 порядка величин, по меньшей мере 4 порядка величин или более. В некоторых вариантах реализации идентифицированные компоненты включают одно или более соединений, представленных на фиг. 7.

[00145] В некоторых иллюстративных вариантах реализации одно или более обнаруженных соединений/компонентов могут содержать одну или более примесей, связанных с продуктом. Иллюстративные примеси, связанные с продуктом, могут представлять собой, но не ограничиваясь ими, молекулярные варианты, прекурсоры, продукты разложения, фрагментированный белок, расщепленный белок, агрегаты, формы посттрансляционной модификации или их комбинации.

[00146] В некоторых конкретных иллюстративных вариантах реализации одно или более обнаруженных соединений/компонентов могут представлять собой примесь, связанную с технологическим процессом. Примесь, связанная с технологическим процессом, может включать примеси, обусловленные процессом производства, например, нуклеиновые клетки и белки клетки-хозяина, антибиотики, сыворотку, другие компоненты среды, ферменты, химические и биохимические технологические реагенты, неорганические соли, растворители, носители, лиганды и другие выщелачиваемые вещества, используемые в производственном процессе, которые могут присутствовать в среде для культивирования клеток или высвобождаться в нее.

[00147] В некоторых вариантах реализации описанный способ представляет собой способ идентификации соединения для анализа среды для культивирования клеток, включающий: подачу образца среды для культивирования клеток в систему жидкостной хроматографии, выполненную с возможностью разделения образца с получением компонентов образца; анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) с получением списка включений; и выполнение итеративного сбора данных в зависимости от данных масс-спектра (DDA) из списка включений для идентификации отдельных соединений в среде для культивирования клеток. В некоторых примерах предложенный способ дополнительно включает культивирование клеток, вырабатывающих рекомбинантный белок, такой как антитело, например, в среде для культивирования клеток, получение образца клеточной культуры в заданный момент времени до определения характеристик компонентов среды для культивирования клеток.

[00148] В некоторых вариантах реализации предложенный способ включает идентификацию компонентов среды для культивирования клеток с помощью описанного способа с последующим изменением одного или более условий культивирования клеточной культуры для уменьшения количества охарактеризованного соединения, образованного при получении белка в клеточной культуре. Иллюстративные условия культивирования клеток, которые могут быть изменены, включают, но не ограничиваясь

ими, температуру, pH, плотность клеток, концентрацию аминокислот, осмоляльность, концентрацию фактора роста, перемешивание, парциальное давление газа, поверхностно-активные вещества или их комбинации.

[00149] В некоторых вариантах реализации клетки, вырабатывающие белок, такой как антитело, представляют собой клетки СНО. В других вариантах реализации клетки представляют собой клетки гибридомы.

ПРИМЕРЫ

[00150] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как реализовать и применять способы согласно настоящему изобретению, и они не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении использованных числовых значений (например, количеств, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах по стоградусной шкале, комнатная температура составляет примерно 25 °С, и давление равно или примерно равно атмосферному.

Пример 1: Материалы и способы

[00151] Объединенные соевые гидролизаты растворяли в воде Milli-Q в качестве матрицы. Добавляли стандартные образцы соединений, меченные стабильными изотопами, в конечной концентрации от нескольких наномоль на литр до сотен миллимоль на литр. Для разделения методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФЖХ) использовали колонку Supelco Discovery HS F5-3. Мультиплексную прицельную регистрацию выбранных ионов (SIM) проводили на масс-спектрометре Thermo Q Exactive HF Orbitrap с получением списка включений. Итеративный сбор данных в зависимости от данных масс-спектра MC2 (DDA) из списка включений проводили на масс-спектрометре Thermo Orbitrap Fusion Lumos. Для сравнения проводили полное сканирование MC1 с последующим обычным DDA MC2. Для обработки данных использовали программное обеспечение Compound Discoverer 3.1.

Пример 2: Мультиплексные прицельные SIM и итеративный сбор данных DDA MC2 улучшают надежную идентификацию соединений для анализа среды для культивирования клеток.

[00152] Используя материалы и способы, описанные в примере 1, осуществляли мультиплексные прицельные SIM и итеративный сбор данных DDA MC2. На фиг. 1 представлено схематическое изображение двух типов сбора данных MC1: (1) обычный сбор данных MC1 при полном сканировании и (2) сбор данных MC1 с прицельной SIM в соответствии с вариантами реализации, описанными в настоящем документе. Сбор данных MC1 с прицельной SIM основан на сортировке молекул по размеру. Для сравнения, MC1 при полном сканировании обеспечивает обнаружение определенного

количества молекул, независимо от размера. Показано, что MC1 с прицельной SIM обеспечивает возможность обнаружения частиц, присутствующих в меньшем количестве, поскольку обнаруживается лишь определенное количество молекул каждого размера, что приводит к улучшению достоверности обнаружения. MC1 с прицельной SIM включает оптимизацию времени ввода пробы и локализирующих окон.

[00153] В частности, на фиг. 2 представлено схематическое изображение иллюстративного протокола выбора регулируемого окна, которое содержит четыре сегмента в диапазоне от m/z 60 до 760,5: сегмент 1, от m/z 60 до m/z 155,5 с шириной окна 10 Да; сегмент 2, от m/z 155 до m/z 250,5, ширина окна 10 Да; сегмент 3, от m/z 250 до m/z 505,5, ширина окна 25 Да; и сегмент 4, от m/z 505,5 до m/z 760,5, ширина окна 25 Да. Каждый сегмент содержал 10 окон, и перекрытие между смешными окнами составляло 0,5 Да. Ширина окон в разных сегментах была различной, однако она была одинаковой в пределах конкретного сегмента. Области, представляющие собой особый интерес, имели меньшую ширину окна. На фиг. 3 представлены спектры MC1, записанные с помощью обычного сбора данных MC1 при полном сканировании (верхняя регистриграмма) или с помощью SIM сбора данных MC1 в соответствии с вариантами реализации, описанными в данном документе (нижняя регистриграмма). По сравнению с MC1, полученным при полном сканировании, мультиплексные прицельные SIM обеспечивали более чистый фон и более высокую интенсивность для нескольких введенных соединений, меченных стабильными изотопами. Например, в методе с мультиплексными прицельными SIM наблюдали лишь 10 нМ гистидина, меченного стабильным изотопом.

[00154] После полного сканирования MC1 или мультиплексной прицельной SIM осуществляли DDA MC2. На фиг. 4 представлено схематическое изображение двух типов DDA MC2: (1) обычный DDA сбор данных MC2 и (2) платформа итеративного DDA MC2 в соответствии с вариантами реализации, описанными в данном документе.

[00155] На фиг. 5 представлены результаты итеративного сбора данных DDA MC2 для большего количества выбранных и фрагментированных частиц, по сравнению с обычным сбором данных DDA MC2, где были выбраны и фрагментированы лишь частицы, представленные в большом количестве. На фиг. 6 представлено схематическое сравнение обычного способа определения характеристик образца и способа с применением комбинации SIM сбора данных в регулируемом окне и итеративного сбора данных MC2 в соответствии с вариантами реализации, описанными в данном документе. На фиг. 7 показано, что комбинирование сбора данных с SIM в регулируемом окне и итеративного сбора данных MC2 обеспечивает идентификацию различных более сложных соединений в образцах соевого гидролизата, включая аминокислоты, дипептиды, трипептиды и т.д. с динамическим диапазоном содержания по меньшей мере 4 порядка величин. На фиг. 8 представлен график, иллюстрирующий возможности итеративного сбора данных MC2. Верхняя линия представляет собой количество частиц в списке исключений масс-фильтра, а нижняя линия представляет собой количество частиц в списке включений масс-фильтра, каждое значение относительно повторного ввода пробы.

Показано, что при увеличении номера повторного ввода пробы список исключений частиц увеличивается, а список включений уменьшается, что, в свою очередь, обеспечивает возможность обнаружения частиц, представленных в меньшем количестве. При итеративном DDA MS2 фоновые ионы в холостом цикле были успешно исключены во время анализа образцов. При многократных итеративных прогонах образцов сканирование MS2 включалось для ионов, представленных в гораздо меньшем количестве. Быстрая и высокодостоверная идентификация компонентов была достигнута посредством поиска в собственной библиотеке, содержащей точную массу, время удерживания и спектры фрагментации, помимо других онлайн баз данных. Предполагается, что описанный способ может быть использован для анализа клеточных метаболитов, такого как анализ метаболитов клеток СНО во время роста клеточной культуры.

[00156] В целом, описанные способы обеспечивают более надежный, чувствительный способ характеристики образцов, таких как среда для культивирования клеток, и отдельных компонентов и метаболитов, присутствующих в них, который может быть использован для усовершенствования технологий получения антител.

[00157] Настоящее изобретение не ограничено по своему объему конкретными вариантами реализации, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, помимо описанных в настоящем документе, станут очевидными для специалиста в данной области на основании вышеизложенного описания и сопроводительных фигур. Такие модификации считаются входящими в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения характеристик образца, включающий:
подачу образца в систему жидкостной хроматографии, выполненную с возможностью разделения образца с получением компонентов образца;
анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) с получением списка включений; и
выполнение итеративного сбора данных в зависимости от данных масс-спектра (DDA) из списка включений для идентификации отдельных компонентов образца.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что система жидкостной хроматографии представляет собой систему обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФЖХ).
3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что анализ фрагментированного образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает использование ионной ловушки или масс-анализатора орбитрэп.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что выполнение итеративного DDA масс-спектра включает использование ионной ловушки или масс-анализатора орбитрэп, оснащенного сегментированным квадрупольным масс-фильтром.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает сегментирование настроек окна отношения массы, в который включены несколько сегментов, и каждый сегмент имеет несколько окон.
6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что несколько сегментов представляют собой три сегмента.
7. Способ по п. 5, отличающийся тем, что несколько сегментов представляют собой четыре сегмента.
8. Способ по любому из пп. 5-7, отличающийся тем, что несколько окон представляют собой 10 окон.
9. Способ по любому из пп. 5-8, отличающийся тем, что все окна в сегменте имеют одинаковую ширину окна.
10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что образец представляет собой среду для культивирования клеток.
11. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный способ предназначен для определения характеристик компонентов и их метаболитов в среде для культивирования клеток.
12. Способ по п. 10 или п. 11, отличающийся тем, что среда для культивирования клеток представляет собой среду на основе сои для культивирования клеток.
13. Способ по п. 10 или п. 11, отличающийся тем, что среда для культивирования клеток предназначена для системы продуцирования на основе рекомбинантных клеток.
14. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанный способ предназначен для определения характеристик компонентов и их метаболитов в среде для

культивирования клеток после инкубации в системе продуцирования на основе рекомбинантных клеток.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что система продуцирования на основе рекомбинантных клеток представляет собой систему млекопитающего.

16. Способ по п. 14, отличающийся тем, что система продуцирования на основе рекомбинантных клеток предназначена для получения белка.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что белок представляет собой антитело, белок слияния, рекомбинантный белок или их комбинацию.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или к смешанному изотипу.

20. Способ идентификации соединения для анализа среды для культивирования клеток, включающий:

подачу образца среды для культивирования клеток в систему жидкостной хроматографии, выполненную с возможностью разделения образца с получением компонентов образца;

анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) с получением списка включений; и

выполнение итеративного сбора данных в зависимости от данных масс-спектра (DDA) из списка включений для идентификации отдельных соединений в среде для культивирования клеток.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что система жидкостной хроматографии представляет собой систему обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФЖХ).

22. Способ по п. 20 или п. 21, отличающийся тем, что анализ фрагментированного образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает использование ионной ловушки или масс-анализатора орбитрэп.

23. Способ по любому из пп. 20-22, отличающийся тем, что выполнение итеративного DDA масс-спектра включает использование ионной ловушки или масс-анализатора орбитрэп, оснащенного сегментированным квадрупольным масс-фильтром.

24. Способ по любому из пп. 20-23, отличающийся тем, что анализ компонентов образца с помощью мультиплексной прицельной регистрации выбранных ионов (SIM) для получения списка включений включает сегментирование настроек окна отношения массы, в который включены несколько сегментов, и каждый сегмент имеет несколько окон.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что несколько сегментов представляют собой три сегмента.

26. Способ по п. 24, отличающийся тем, что несколько сегментов представляют собой четыре сегмента.

27. Способ по любому из пп. 24-26, отличающийся тем, что несколько окон

представляют собой 10 окон.

28. Способ по любому из пп. 24-27, отличающийся тем, что все окна в сегменте имеют одинаковую ширину окна.

29. Способ по любому из пп. 20-28, отличающийся тем, что среда для культивирования клеток представляет собой среду на основе сои для культивирования клеток.

30. Способ по любому из пп. 20-29, отличающийся тем, что среда для культивирования клеток предназначена для системы продуцирования на основе рекомбинантных клеток.

31. Способ по любому из пп. 20-30, отличающийся тем, что образец среды для культивирования клеток представляет собой образец среды для культивирования клеток, полученный после инкубации в системе продуцирования на основе рекомбинантных клеток.

32. Способ по п. 31 или п. 32, отличающийся тем, что система продуцирования на основе рекомбинантных клеток представляет собой систему млекопитающего.

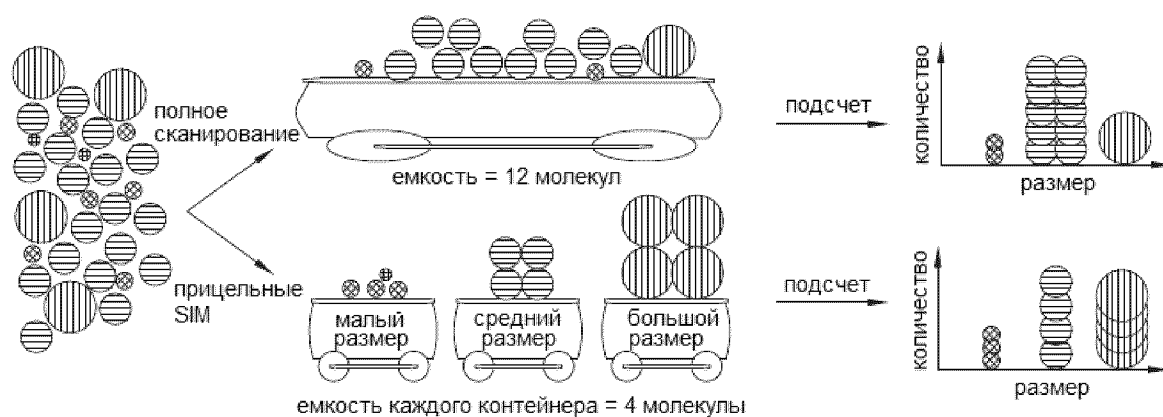
33. Способ по п. 31 или п. 32, отличающийся тем, что система продуцирования на основе рекомбинантных клеток предназначена для получения белка.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что белок представляет собой антитело, белок слияния, рекомбинантный белок или их комбинацию.

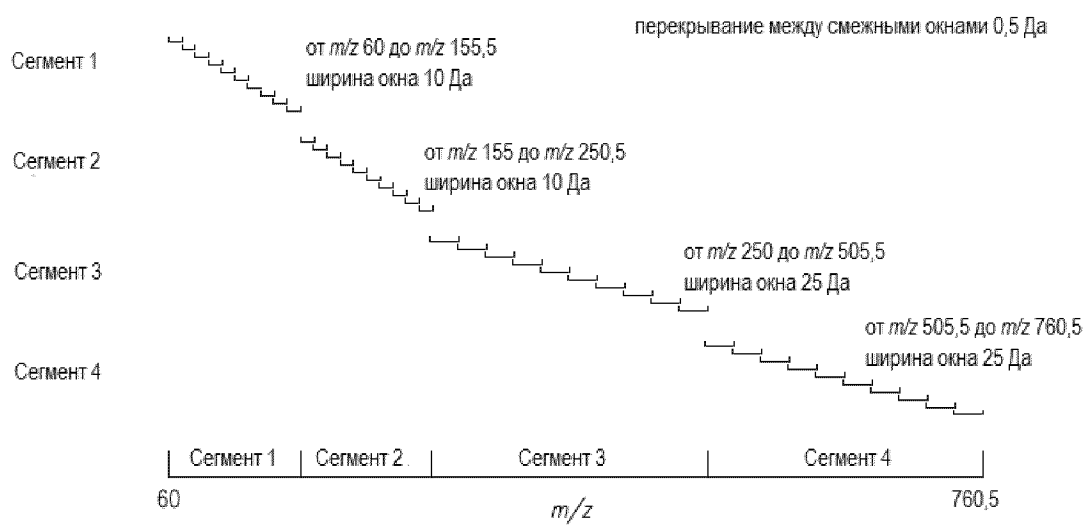
35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело.

36. Способ по п. 35, отличающийся тем, что моноклональное антитело относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или к смешанному изотипу.

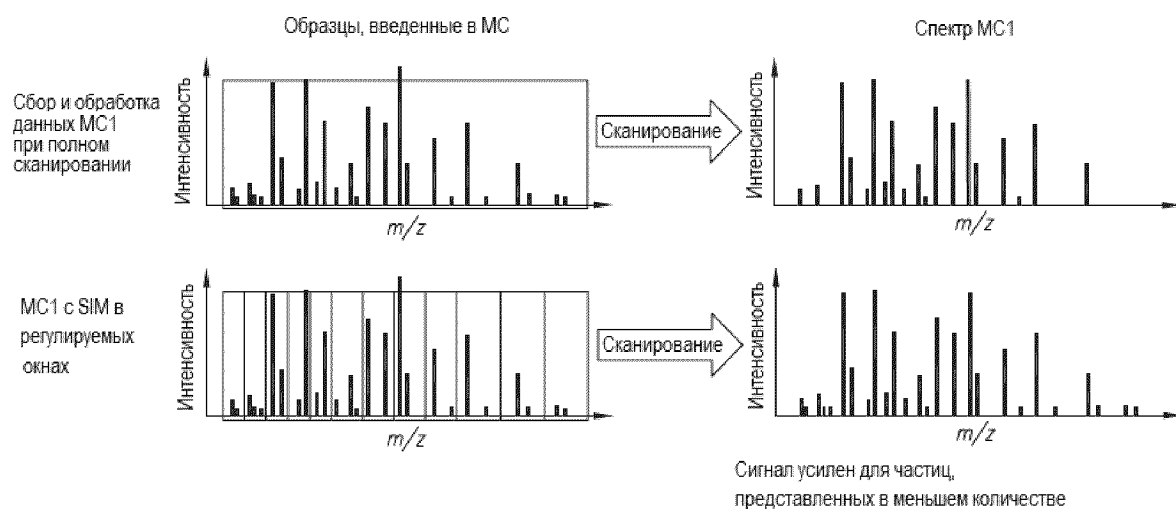
По доверенности



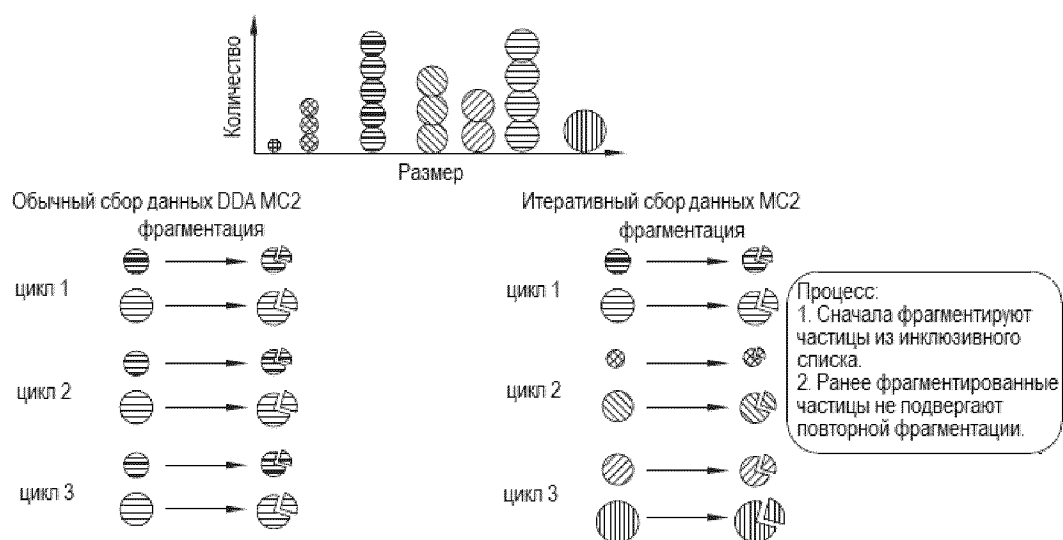
Фиг. 1



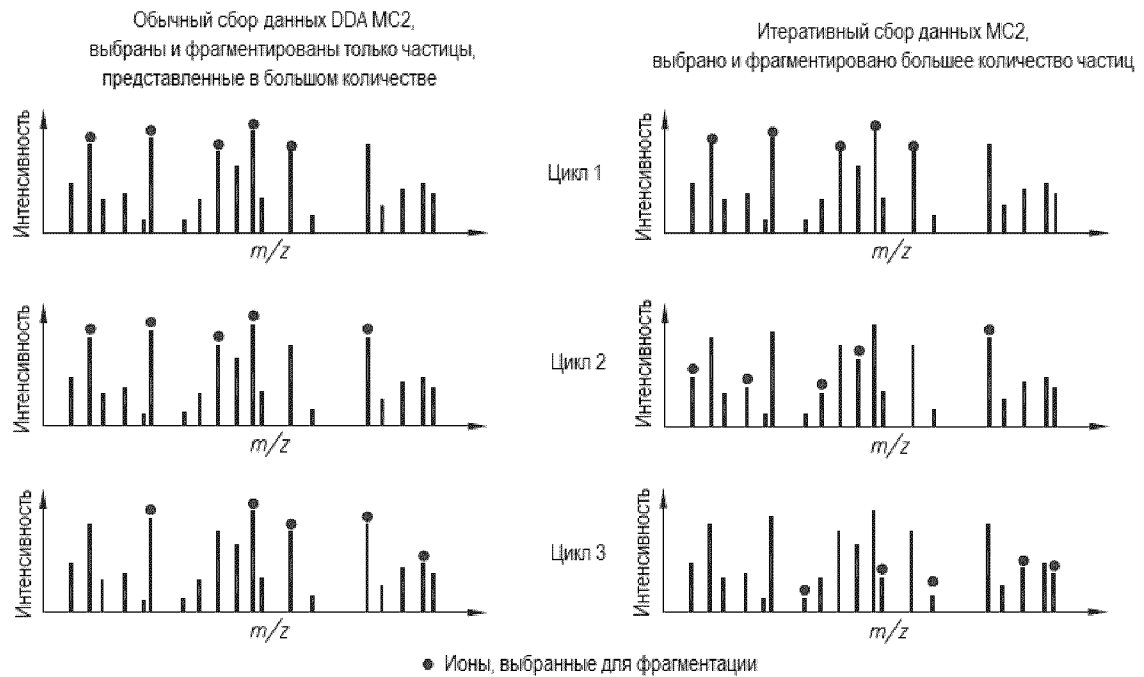
Фиг. 2



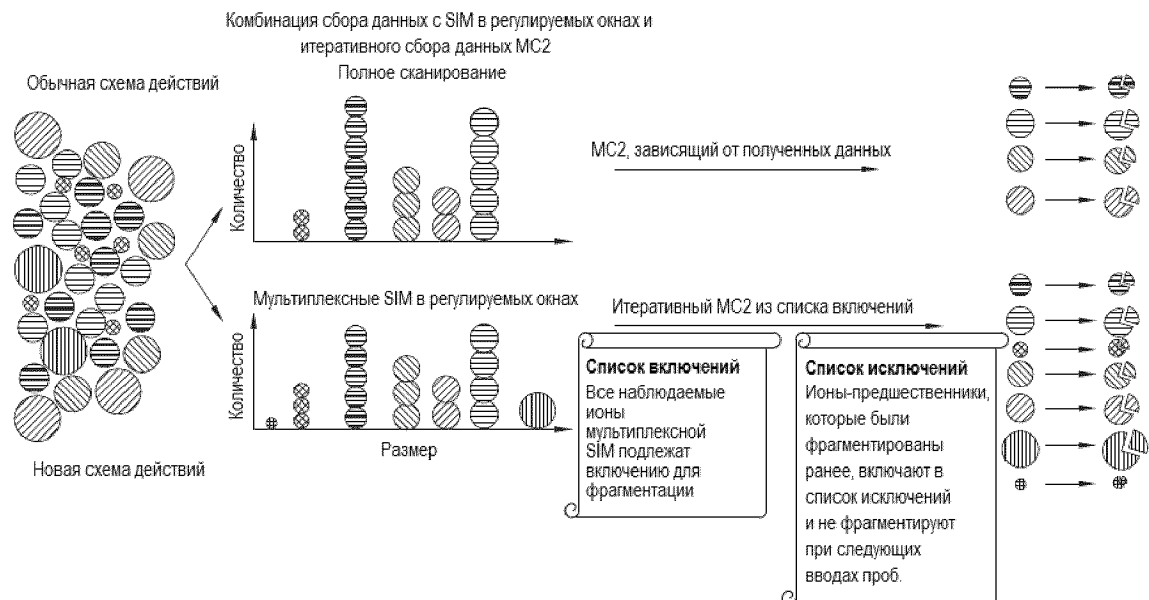
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



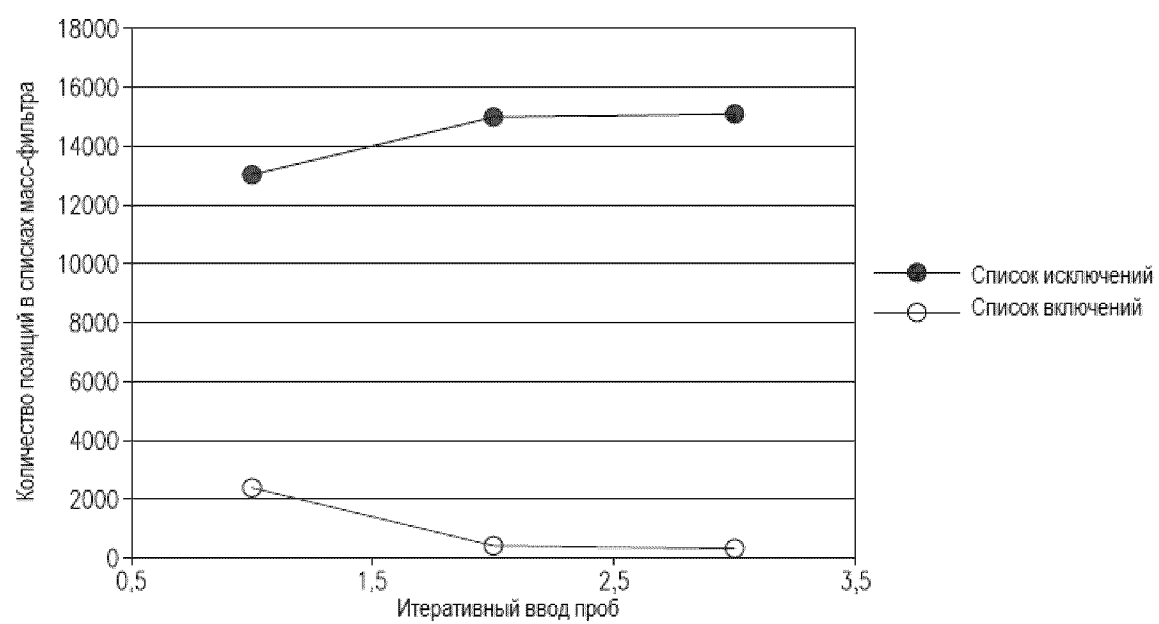
Фиг. 6

Обнаружение соединений, меченных стабильными изотопами, введенных в соевый гидролизат в разных концентрациях

Соединение, меченное стабильным изотопом	Концентрация				
	1 мкМ	0,1 мкМ	0,01 мкМ	0,001 мкМ	0,0001 мкМ
Глицин	Оба	Оба	Оба	Оба	Оба
Аланин	Оба	НО	НО	НО	НО
Серин	Оба	Оба	Только в SIM	НО	НО
Пролин	Оба	Только в SIM	Только в SIM	НО	НО
Валин	Оба	НО	НО	НО	НО
Треонин	Оба	Оба	НО	НО	НО
Никотинамид	Оба	НО	НО	НО	НО
Никотинат	Оба	Только в SIM	НО	НО	НО
N-ацетилаланин	Оба	Оба	Оба	Оба	Оба
Аспарагин	Оба	Оба	Только в SIM	НО	НО
Аспарагиновая кислота	Оба	Оба	Оба	НО	НО
Орнитин	Оба	НО	НО	НО	НО
Лейцин	Оба	Оба	Только в SIM	НО	НО
Изолейцин	Оба	Оба	Оба	НО	НО
Глутамин	Оба	Оба	Оба	НО	НО
Глутаминовая кислота	Оба	Оба	НО	НО	НО
Лизин	Оба	Оба	НО	НО	НО
Метионин	Оба	Оба	Оба	НО	НО
Гистидин	Оба	Оба	НО	НО	НО
Фенилаланин	Оба	Оба	НО	НО	НО
Аргинин	Оба	Только в SIM	НО	НО	НО
Тирозин	Оба	Оба	Только в FS	НО	НО
Триптофан	Оба	Оба	Оба	Оба	Оба
Цистин	Оба	Оба	Оба	НО	НО
5'-Метилтиоаденозин	Оба	Оба	Оба	НО	НО
NEPES D16	Оба	Оба	НО	НО	НО
Витамин B12 2+	Оба	Только в SIM	Только в SIM	Только в SIM	Только в SIM
Фолат (витамин B9) 2+	Оба	Только в SIM	НО	НО	НО

Только в SIM: обнаружен только с прицельными SIM
Только в FS: обнаружен только при полном сканировании
Оба: обнаружен обоими способами сбора данных
НО: не обнаружен ни одним способом сбора данных

Фиг. 7



Фиг. 8